



João Rodrigo Pinto de Almeida Lino

Licenciado em Bioquímica

**Fitorremediação de águas residuais
contaminadas com Cd e Ni por três
genótipos de *Miscanthus***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Energia e Bioenergia

Orientadora: Prof. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando,
Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Co-orientadora: Doutora Florbela de Oliveira Carvalheiro Esteves
Amaro, Investigadora Auxiliar, Laboratório Nacional de Engenharia e
Geologia

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL

Arguente: Doutor Luís Jorge Abreu Chorão de Quelhas Duarte, LNEG

Vogais: Prof. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando, FCT/UNL



João Rodrigo Pinto de Almeida Lino

Licenciado em Bioquímica

**Fitorremediação de águas residuais
contaminadas com Cd e Ni por três
genótipos de *Miscanthus***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Energia e Bioenergia

Orientadora: Prof. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando,
Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Co-orientadora: Doutora Florbela de Oliveira Carvalheiro Esteves
Amaro, Investigadora Auxiliar, Laboratório Nacional de Engenharia e
Geologia

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL

Arguente: Doutor Luís Jorge Abreu Chorão de Quelhas Duarte, LNEG

Vogais: Prof. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando, FCT/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

“Fitorremediação de águas residuais contaminadas com Cd e Ni por três genótipos de
Miscanthus”

Copyright © João Rodrigo Pinto de Almeida Lino, FCT-UNL, UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido, ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Partes do presente trabalho foram apresentadas publicamente:

Artigo em Acta de Congresso Internacional:

Lino, J., Fernando, A.L., Barbosa, B., Boléo, S., Costa, J., Duarte, M.P., Mendes, B. (2014) Phytoremediation of Cd and Ni Contaminated Wastewaters by *Miscanthus*. In: Hoffmann C, Baxter D, Maniatis K, Grassi A, Helm P (Eds.), Proceedings of the 22th European Biomass Conference and Exhibition, Setting the course for a Biobased Economy, Hamburg, Germany, 23 - 26 June 2014, ETA-Renewable Energies, pp 303 - 307. (ISSN 2282-5819, DOI: 10.5071/22ndEUBCE2014-1CV.4.24; ISBN: 978-88-89407-52-3)

Poster em Congresso Internacional:

Lino, J., Fernando, A.L., Barbosa, B., Boléo, S., Costa, J., Duarte, M.P., Mendes, B. (2014) Phytoremediation of Cd and Ni Contaminated Wastewaters by *Miscanthus*. 22th European Biomass Conference and Exhibition, Setting the course for a Biobased Economy, Hamburg, Germany, 23 - 26 June 2014

Comunicação Oral em Curso Internacional:

Lino, J., Fernando, A.L. (2014) Phytoremediation of Cd and Ni Contaminated Wastewaters by *Miscanthus*. Summer School: Lignocellulosic Crops as Feedstock for Future Biorefineries. Caparica, Portugal, 27-31 July 2014.

Agradecimentos

- Em primeiro lugar agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Ana Luísa Fernando, pela oportunidade e por todo o conhecimento que me transmitiu, mas mais importante pelo que me fez crescer enquanto Homem. Pela simpatia e paciência em momentos mais difíceis.

- À Doutora Florbela Carvalheiro e à Patrícia Moniz, um agradecimento especial. Foram incansáveis, disponíveis mesmo quando não o estavam, muito obrigado.

- À presidente do DCTB, Departamento de Ciências e Tecnologias da Biomassa e Coordenadora do Mestrado em Energia e Bioenergia, a professora Benilde Mendes.

- À Dona Rita, à Dona Rosa e à Dona Céu Penedo, pela indispensável e preciosa ajuda prestada no laboratório, em diferentes fases deste trabalho.

- Aos meus colegas, Jorge Costa e Bruno Barbosa, por toda ajuda e colaboração e principalmente pela amizade. Foi um prazer.

- À Mariana, Raquel, Susana, Vanessa, João, Joana, Sarah Sidella e Sara Bóleo, agradeço os bons momentos no laboratório e toda a disponibilidade quando precisei de ajuda.

- Ao DCTB e ao LNEG, que disponibilizaram todos os meios para a execução prática deste trabalho.

- À Uniao Europeia, pelo financiamento do projecto OPTIMA (Optimization of perennial grasses for biomass production, Grant Agreement No: 289642, Collaborative project, FP7-KBBE-2011.3.1-02), no qual a dissertação se encontrava enquadrada.

- À Steph, ao Tobias e ao Nuno, pelo papel fundamental que tiveram na elaboração deste trabalho.

- A toda a minha família e a todos os meus Amigos, um enorme obrigado.

- À Sheila, às minhas irmãs, ao meu pai, ao Vitor e em especial à minha mãe, por todo o apoio em todos os momentos. Grandes responsáveis pelo que sou.

Resumo

Fitorremediação, o uso de vegetação para a descontaminação de diferentes matrizes, é uma estratégia de baixo custo e tem sido apontada como uma metodologia passível de atenuar e estabilizar águas residuais. Neste contexto, este estudo tem como principal objectivo avaliar a capacidade fitorremediadora de três genótipos de *Miscanthus* (duas espécies - *Miscanthus sinensis* e *Miscanthus floridulus*, e um híbrido – *Miscanthus x giganteus*) a águas residuais contaminadas com cádmio e níquel (2,0 mg Ni/L e 0,2 mg Cd/L). Os resultados demonstraram que a irrigação com águas residuais contaminadas com Cd e Ni não afecta a produtividade dos três genótipos de *Miscanthus* em estudo e que o *M. x giganteus* e o *M. floridulus* registaram produtividades mais elevadas que o *M. sinensis*. Contudo, o *M. x giganteus*, demonstrou tendencialmente uma redução da sua produção com a contaminação de Cd. A biomassa obtida dos ensaios irrigados com águas residuais contaminadas apresentaram maior teor de Cd e Ni, do que a biomassa recolhida dos ensaios Controlo. O sistema *Miscanthus*-solo registou valores de remoção de Cd de 100%, e de Ni de 96-100%, no caso do *M. x giganteus* e do *M. sinensis*. O *M. floridulus*, contudo, demonstrou menos potencial de fitorremediação no que diz respeito à remoção de Ni das águas residuais: apenas 58% de Ni foi removido pelo sistema “biofiltrador”. Ainda assim, verificou-se a acumulação de Cd e Ni no perfil superior do solo devido à irrigação com as águas residuais contaminadas, o que demonstra a necessidade de controlo desta técnica de modo a prevenir possíveis efeitos negativos no ambiente.

Palavras-chave: *Miscanthus* spp.; culturas energéticas; fitorremediação; águas residuais; cádmio; níquel.

Abstract

Phytoremediation, the use of vegetation for the decontamination of different matrices, is not a very expensive strategy and has been presented as an approach to restore or attenuate and stabilize wastewaters. In this context, this research work aims to study the phytoremediation response of three *Miscanthus* genotypes (two species - *Miscanthus sinensis* and *Miscanthus floridulus*, and a hybrid – *Miscanthus* × *giganteus*) to nickel and cadmium contaminated waters (2,0 mg Ni/L and 0,2 mg Cd/L). Results show that the irrigation with wastewaters contaminated with Ni and Cd did not affect the productivity of the studied *Miscanthus* genotypes and that *M. x giganteus* and *M. floridulus* were more productive than *M. sinensis*. However, *M. x giganteus*, but not *M. sinensis* and *M. floridulus* showed a trend to a lower yield due to Cd contamination. Biomass obtained with Cd and Ni contaminated waters presented higher Cd and Ni content than biomass from control pots. *Miscanthus*-soil systems accomplished 100% removal of Cd and *M. x giganteus* and *M. sinensis*, 96-100% removal of Ni from wastewaters. *M. floridulus*, however, showed less phytoremediation potential concerning Ni removal from wastewater: only 58% Ni was removed by the “biofilter” system. Yet, an accumulation of Ni and Cd were observed in the topsoil due to the irrigation with the contaminated wastewaters, thus showing that irrigation with wastewaters should be clearly controlled in order to avoid negative impacts on the environment.

Key-words: *Miscanthus* spp.; energy crops; phytoremediation; wastewaters; cadmium; nickel.

Índice Geral

Agradecimentos	ix
Resumo.....	xi
Abstract	xiii
Índice de Figuras	xvi
Índice de Tabelas.....	xvii
1. Introdução.....	1
1.1. Culturas Energéticas.....	2
1.2. <i>Miscanthus spp.</i>	8
1.2.1. Biologia e Morfologia	10
1.2.2. Metabolismo	13
1.2.3. Propagação.....	14
1.2.4. Factores Edafo-climáticos	15
1.2.5. Colheita, cultivo e armazenamento	16
1.2.6. Produção	17
1.3. Objectivos do trabalho	25
2. Parte Experimental.....	27
2.1. Métodos Analíticos.....	28
2.1.1. Metodologias analíticas utilizadas na caracterização físico-química e biológica das águas residuais e das águas de percolação	28
2.1.2. Metodologias analíticas aplicadas às plantas	29
2.1.3. Metodologias aplicadas aos solos	32
2.1.4. Equipamentos e análise estatística dos resultados.....	33
3. Resultados e Discussão	35
3.1. Caracterização da água residual e da água da rede do Campus da FCT-UNL	35
3.2. Caracterização das águas de percolação.....	36
3.3. Caracterização da Biomassa.....	40
3.3.1. Parâmetros Morfológicos e de Produtividade	40
3.3.2. Produtividade	46
3.3.3. Caracterização Química da Biomassa.....	51
3.4. Caracterização do Solo	69
3.4.1. Parâmetros físico-químicos	69
3.4.2. Carbono Orgânico	72
3.4.3. Metais.....	73
Conclusão	75
Bibliografia	76
Anexos.....	89

Índice de Figuras

Figura 1.1: Esquema da distribuição da utilização da biomassa.....	1
Figura 1.2: Conceito de biorrefinaria	2
Figura 1.3: Interdisciplinaridade da Fitorremediação.....	5
Figura 1.7: <i>Miscanthus floridulus</i>	10
Figura 1.5: <i>Miscanthus sinensis</i>	12
Figura 1.6: <i>Miscanthus x giganteus</i>	13
Figura 3.1: Altura média dos caules.....	41
Figura 3.2: Diâmetro médio dos caules	43
Figura 3.3: Distância média entre 2º e 3º nó (cm).....	44
Figura 3.4: Índice de área foliar médio	46
Figura 3.5: Produtividade total média de <i>Miscanthus</i> (g/m ² , matéria seca).....	48
Figura 3.6: Produtividade média de folhas para os diferentes tipos de irrigação (g/m ² , matéria seca).....	49
Figura 3.7: Produtividade média de caules para os diferentes tipos de irrigação (g/m ² , matéria seca).....	50
Figura 3.8: Teor médio de cinzas dos caules (% de matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação.....	52
Figura 3.9: Teor médio de cinzas das folhas (% de matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação.....	53
Figura 3.10: Teor médio de cinzas da panícula (% de matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação.....	54
Figura 3.11: Teor médio de cinzas da Manta Morta (% de matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação.....	55
Figura 3.12: Teor médio de azoto de caules de <i>Miscanthus</i> (% N, matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação	57
Figura 3.13: Teor médio de azoto de folhas de <i>Miscanthus</i> (% N, matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação	58
Figura 3.14: Teor médio de fósforo de caules de <i>Miscanthus</i> (% N, matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação	60
Figura 3.15: Teor médio de fósforo de folhas de <i>Miscanthus</i> (% N, matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação	61
Figura 3.16: Teor médio de Níquel nos caules de <i>Miscanthus</i> (mg Ni / kg de matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação.....	65
Figura 3.17: Teor médio de Níquel nas folhas de <i>Miscanthus</i> (mg Ni/kg de matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação.....	66
Figura 3.18: Percentagem de fibra total para cada genótipo em estudo.....	69
Figura 3.19: Teor médio de Cádmio no solo – superior e inferior (mg Cd/kg ms) para os diferentes genótipos	74
Figura 3.20: Teor médio de Níquel no solo – superior e inferior (mg Ni/kg ms) para os diferentes genótipos	74

Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Descrição dos três tipos principais de culturas energéticas.....	3
Tabela 1.2: Descrição das várias técnicas de fitorremediação. (adaptado de Ali <i>et al.</i> , 2013).	6
Tabela 1.3: Características agronómicas das culturas energéticas mais utilizadas na Europa (Monti, 2014)	9
Tabela 1.4: Benefícios, riscos e propostas para contrariar os mesmos, na produção de <i>Miscanthus</i>	19
Tabela 2.1; Métodos analíticos utilizados na caracterização físico-química das águas de irrigação e dos percolados.	29
Tabela 2.2: Métodos analíticos utilizados na caracterização físico-química da biomassa recolhida.....	31
Tabela 2.3: Condição de análise para a coluna cromatográfica HPX-87H	32
Tabela 2.4: Métodos analíticos utilizados na caracterização físico-química dos solos recolhidos	33
Tabela 3.1: Parâmetros físico-químicos da água residual e da água da rede do <i>Campus</i> da FCT-UNL, usadas na irrigação dos ensaios	35
Tabela 3.2: Teor de metais (mg/L) nas águas residuais contaminadas com Cd e Ni e água da rede	36
Tabela 3.3: Qualidade físico-química das águas de percolação	37
Tabela 3.4: Teor de Cádmio nas águas de percolação (mg Cd/L)	39
Tabela 3.5: Teor de Níquel nas águas de percolação (mg Ni/L)	39
Tabela 3.6: Altura média dos caules (cm)	40
Tabela 3.7: Diâmetro médio dos caules (mm)	42
Tabela 3.8: Distância média entre 2º e 3º nó (cm)	43
Tabela 3.9: Número de Caules por m ²	44
Tabela 3.10: Índice de área foliar médio (cm ² /cm ²)	46
Tabela 3.11: Produtividade Total média de <i>Miscanthus</i> (g/m ² , matéria seca).....	47
Tabela 3.12: Produtividade média de folhas para os diferentes tipos de irrigação (g/m ² , matéria seca).....	48
Tabela 3.13: Produtividade média de caules para os diferentes tipos de irrigação (g/m ² , matéria seca).....	49
Tabela 3.14: Produtividade média de biomassa não <i>Miscanthus</i> , panícula e manta morta, para os diferentes tipos de irrigação (g/m ² , matéria seca).....	50
Tabela 3.15: Teor de cinzas dos caules (% matéria seca).....	51
Tabela 3.16: Teor de cinzas das folhas (% matéria seca)	53
Tabela 3.17: Teor de cinzas da panícula (% matéria seca).....	53
Tabela 3.18: Teor de cinzas da manta morta (% matéria seca).	54
Tabela 3.19: Teor de cinzas da biomassa não <i>Miscanthus</i> (% matéria seca).....	55
Tabela 3.20: Teor de azoto nos caules (% N, matéria seca).....	56
Tabela 3.21: Teor de azoto nas folhas (% N, matéria seca)	57
Tabela 3.22: Teor de azoto na panícula (% N, matéria seca)	58
Tabela 3.23: Teor de azoto na manta morta (% N, matéria seca)	59
Tabela 3.24: Teor de azoto na biomassa não <i>Miscanthus</i> (% N, matéria seca)	59

Tabela 3.25: Teor de fósforo nos caules (% P, matéria seca).....	60
Tabela 3.26: Teor de fósforo nas folhas (% P, matéria seca)	61
Tabela 3.27: Teor de fósforo na panícula (% P, matéria seca)	61
Tabela 3.28: Teor de fósforo na manta morta (% P, matéria seca)	62
Tabela 3.29: Teor de fósforo na biomassa não <i>Miscanthus</i> (% P, matéria seca).....	62
Tabela 3.30: Teor de Cádmio nos caules (mg (Cd)/ kg matéria seca)	63
Tabela 3.31: Teor de Cádmio nas folhas (mg (Cd)/ kg matéria seca).....	63
Tabela 3.32: Teor de Cádmio na panícula (mg (Cd)/ kg matéria seca)	64
Tabela 3.33: Teor de Cádmio na biomassa não <i>Miscanthus</i> (mg (Cd)/ kg matéria seca)	64
Tabela 3.34: Teor de Cádmio na manta morta (mg (Cd)/ kg matéria seca).....	64
Tabela 3.35: Teor de Níquel nos caules (mg (Ni)/ kg matéria seca).....	65
Tabela 3.36: Teor de Níquel nas folhas (mg (Ni)/ kg matéria seca)	66
Tabela 3.37: Teor de Níquel na panícula (mg Ni/kg matéria seca)	67
Tabela 3.38: Teor de Níquel na biomassa não <i>Miscanthus</i> (mg Ni/kg matéria seca)	67
Tabela 3.39: Teor de fibra e seus constituintes para cada genótipo (% , matéria seca)	68
Tabela 3.40: Parâmetros físico-químicos do solo 0-20 cm (superior).....	70
Tabela 3.41: Parâmetros físico-químicos do solo 20-40 cm (inferior)	71
Tabela 3.42: Teor de carbono orgânico - solo inferior.....	72
Tabela 3.43: Teor de carbono orgânico - solo superior	73

1. Introdução

As questões ambientais são atualmente uma das problemáticas mais discutidas a nível mundial, gerando conflitos do foro económico, político e social. A escassez dos recursos aliada à falta de equilíbrio na sua utilização por uma população em crescimento exponencial, levou-nos a um estado de insustentabilidade. A aposta na utilização de formas alternativas de produção de energia é fulcral e cada vez mais, uma realidade. Sendo assim é necessário promover, como medida prioritária, uma transição para um sistema energético mais diversificado e deste modo assegurar um desenvolvimento sustentável e a proteção do meio ambiente, como por exemplo no controlo eficiente das emissões de Gases como Efeito Estufa, GEE (Brosse *et al.*, 2009).

A biomassa vegetal é considerada uma das melhores alternativas aos combustíveis de origem fóssil, pois é produzida por fotossíntese e representa o recurso biológico renovável mais abundante do solo (Kumar e Gomes, 2008). Este tipo de biomassa existe em grande abundância, aproximadamente 10^{11} t por ano (Kuhad e Singh, 1993), e representa cerca de 10% (55 EJ) da energia primária produzida – a quarta maior fonte seguida do petróleo, carvão e gás natural.

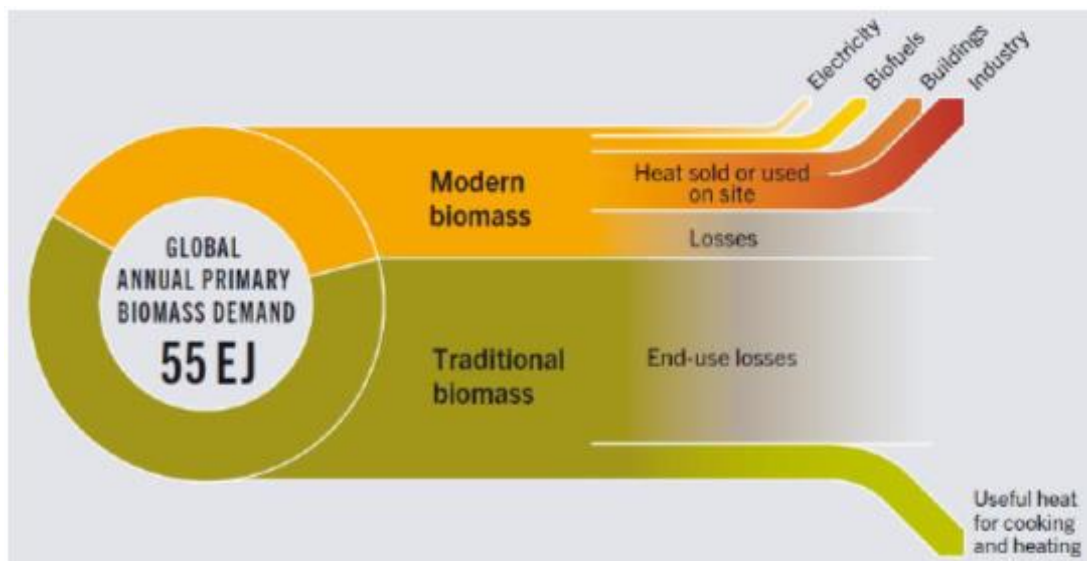


Figura 1.1: Esquema da distribuição da utilização da biomassa

Por isso, têm surgido diversos esforços para um maior aproveitamento da biomassa. O aparecimento do conceito de biorrefinaria (Figura 1.2) e a sua exploração até ao aparecimento de unidades industriais são exemplo disso mesmo. De acordo com este conceito, todos os componentes da biomassa e ainda os resíduos e subprodutos gerados no processo, são aproveitados de modo a obter energia e produtos de valor acrescentado. As culturas

energéticas e os resíduos lenhocelulósicos estabelecem-se como a principal matéria-prima a utilizar pelas biorrefinarias.

Estas instalações, sendo já uma realidade emergente em alguns países, necessitam de desenvolvimentos científicos e tecnológicos que lhes permitam ultrapassar as suas atuais limitações. O desenvolvimento destas instalações passa por aperfeiçoar os processos e equipamentos de modo a utilizar matérias-primas de diferente origem tendo em conta a sua heterogeneidade e complexidade estrutural (Bozell *et al.*, 2007), de modo a minimizar os desperdícios e a maximizar o rendimento, não só para a produção de combustíveis líquidos como também em produtos de valor acrescentado (Carvalho *et al.*, 2008).

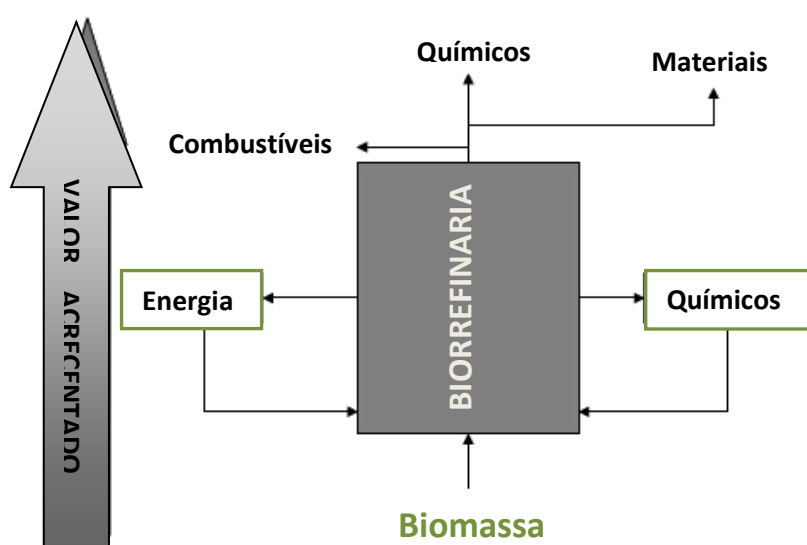


Figura 1.2: Conceito de biorrefinaria (Adapt, Carvalho *et al.*, 2008)

A evolução no desenvolvimento de métodos mais sustentáveis para a produção de biocombustíveis corrobora a aposta descrita, pois os biocombustíveis de 2ª e 3ª geração, demonstram uma significativa melhoria quando comparados com os biocombustíveis de 1ª geração, produzidos a partir de culturas alimentares.

1.1. Culturas Energéticas

As espécies de plantas anuais ou perenes, cultivadas para a produção de energia sólida, líquida ou gasosa, as culturas energéticas (C.E.) enquadram-se como um substituto viável às fontes de energia não renováveis, tais como os combustíveis fósseis. Para além dos biocombustíveis, existem diversos produtos de valor acrescentado que podem ser obtidos através do amido, da celulose, do açúcar e de óleos, componentes principais de diversas C.E.

Tabela 1.1: Descrição dos três tipos principais de culturas energéticas

Tipo de Cultura	Descrição
Culturas ricas em açúcares	Espécies ricas em açúcar, que têm como principal aplicação energética, a produção de biocombustíveis.
Culturas oleaginosas	Culturas que apresentam nas suas sementes teores elevados de óleo, que pode ser convertido a biodiesel ou usado directamente na produção de calor e de electricidade.
Culturas lenhocelulósicas	Têm como componentes principais a celulose, a hemicelulose e a lenhina, cada um deles susceptível de valorização. São culturas caracterizadas por elevadas produtividades de matéria seca. Têm a vantagem de não serem um tipo de C.E. que possa ser usada para fins alimentares, como acontece com os dois exemplos anteriores que vão de encontro a uma inevitável competição problemática.

A produção de energia utilizando C.E. também tem, como todos os processos de produção de energia, alguns aspectos negativos (Fernando *et al.*, 2010, 2011). No entanto, se tidos em conta alguns critérios, o processo pode ser considerado viável. Para tal, a produção de energia a partir de C.E. tem de obedecer a critérios fundamentais para a sua aprovação enquanto C.E., entre os quais (Boléo, 2011):

- adaptação às condições edafo-climáticas em questão;
- facilidade de introdução em rotações agrícolas pré-existente;
- rendimentos elevados, uniformes e contínuos, da quantidade de biomassa de qualidade, com elevada percentagem de matéria seca na altura da colheita;
- elevada taxa de conversão de luz;
- elevada eficiência no uso da água, pois o teor de humidade é dos principais limitantes à valorização das C.E.;
- elevada densidade energética das plantas (expresso em MJ.kg⁻¹);
- competitividade económica superior às culturas tradicionais;
- a relação do output/input de energia no sistema - tem de ser positivo de modo a que todo o processo seja viável quer económica, quer ambientalmente. Sendo assim, os problemas logísticos de processos como a colheita, o transporte e o armazenamento, têm de ser resolvidos;

- maquinaria adequada (principalmente nas operações de colheita);
- facilidade de colheita e armazenamento;
- resistência a factores adversos, como pestes, doenças, secas e inundações;

A problemática ambiental é um dos pontos que tem despertado maior discussão entre as comunidades científica e industrial, pois alguns estudos defendem que não é correto classificar como nulas as emissões de CO₂ produzidas pelas C.E. na sua valorização energética. As quantidades de CO₂ produzidas durante a instalação das próprias culturas podem ser elevadas devido, por exemplo, ao combustível fóssil utilizado pelos veículos que transportam a biomassa. Ainda assim, de referir que a pegada ecológica da produção de energia a partir das C.E. é significativamente inferior à grande maioria das tecnologias de produção de energia a partir de fontes não renováveis.

Para ser sustentável, a produção de C.E. tem de conservar e proteger os recursos naturais, incluindo a água potável que da totalidade da água existente representa apenas 2,5% (dos quais, 70% estão inacessíveis para consumo humano). O aumento da utilização de culturas agrícolas para a produção de bioenergia, levou a novos desafios na gestão dos recursos hídricos. Como a produção de C.E. é altamente dependente de água, uma gestão alternativa de modo a melhorar a sua disponibilidade deve ser implementada, como por exemplo, a drenagem controlada que melhora a disponibilidade (e qualidade) da água para a planta, permitindo um controlo mais eficaz da água utilizada ou através de sistemas de tratamento de efluentes que oferecem a possibilidade de os utilizar na irrigação de C.E.

Para além de permitir a conservação da água potável, a produção de C.E. com recurso a águas residuais, permite o tratamento de efluentes nocivos e pode diminuir os custos de todo o processo (Sims e Riddell-Black, 1998; Zalesny *et al*, 2009). Contudo, existem implicações que não podem ser ignoradas. A utilização destes efluentes aumenta a possibilidade de poluição das águas subterrâneas e aumenta também a probabilidade de danificar a produtividade dos solos a longo prazo, tornando vital a implementação de medidas que garantam a sustentabilidade ambiental do processo (Tzanakakis *et al.*, 2011).

Dimitrou e Rosenqvist (2011), defendem que a utilização de águas residuais na produção de culturas de crescimento rápido permite melhorias, tanto ao nível ambiental como económico. Concluem neste estudo que este tipo de irrigação permite um crescimento significativo da biomassa e ainda redução na fertilização necessária.

As culturas energéticas podem assim ser utilizadas no tratamento por fitorremediação, de solos contaminados extraíndo, absorvendo, imobilizando ou degradando os contaminantes do solo ou da água em questão. A junção dos processos de fitorremediação e de irrigação com

águas residuais, pode ser vista como de interesse ambiental significativo, pois preservam a estrutura e a textura natural do solo, e do ponto de vista económico pois pode gerar grandes quantidades de biomassa (Varma, 2004; Barbosa *et al.*, 2014).

Idealmente, o objectivo de um determinado processo de remediação, será a restauração da multifuncionalidade do solo e das águas subterrâneas, sendo removido do local em questão todo e qualquer contaminante. Esta é uma preocupação crescente devido a anos de contaminações desmedidas dos solos e por consequência, de muitos cursos de água subterrânea. A remoção dos contaminantes pode ser efectuada através de vários processos de remediação tais como: processos físico-químicos (Imobilização e mobilização), biorremediação e fitorremediação.

O conceito de fitorremediação, sugerido por Chaney em 1983, enquadra-se no uso de plantas e dos seus microrganismos associados, para a redução da concentração ou limpeza de substâncias tóxicas para o solo, que consequentemente resultariam em poluentes ambientais. Esta técnica pode ser usada na remoção de compostos inorgânicos (metais pesados) ou orgânicos (pesticidas). É uma estratégia inovadora, amiga do ambiente e, eficiente económica e ambientalmente. Mench *et al.* (2009) considera que as plantas utilizadas na fitorremediação efectuem a remoção dos contaminantes sem afectar, na maioria dos casos, a qualidade do solo. A matéria orgânica que estas conferem ao solo, permite a salvaguarda da sua fertilidade e utilidade, pois a erosão é evitada, tal como a lixiviação de poluentes.

A Figura 1.3 demonstra o carácter interdisciplinar da fitorremediação. O futuro desta área científica passa pelo conhecimento e enquadramento dos diferentes campos de estudo, num conceito único (fitorremediação).



Figura 1.3: Interdisciplinaridade da Fitorremediação

Do ponto de vista económico existem diversas vantagens para a aplicação da fitorremediação, quando comparada com outras técnicas de remediação. Tem baixo custo de instalação e de manutenção, a sua aplicação em terrenos de grande escala é praticável e rentável, há a possibilidade de extracção de metais pesados com valor de mercado (Ni, Tl e Au) e a fitoextração aumenta gradualmente a qualidade do solo, tornando possível a futura plantação de culturas com maior valor de mercado (Vangronsveld *et al.*, 2009). Recentemente, pela crescente competição entre culturas alimentares e energéticas, diversos países recomendaram o cultivo de C.E. (bem aceite pelo público em geral) em terrenos contaminados que não são susceptíveis de produzir alimentos, tornando-se esta numa situação muito positiva aliando a produção de biomassa para energia, à remediação dos solos (Juwarkar *et al.*, 2008; Weyens *et al.*, 2009; Dauber *et al.*, 2012). A grande desvantagem da fitorremediação prende-se no tempo necessário para levar a cabo a descontaminação dos solos (Lucian *et al.*, 2011).

A fitoextração tem vindo a ser muito sugerida como uma técnica inovadora de remediação (principalmente de metais pesados), muito pelo seu potencial de rentabilidade económica. A diferença na abordagem reside na utilização de plantas de crescimento rápido, com sistemas radiculares extensos, de fácil propagação, resistentes a pragas, acumuladoras dos metais-alvo e no facto de não servirem de alimento para animais (Lofty e Mostafa, 2013; Ali *et al.*, 2013). Esta técnica tem vindo a ser aplicada em culturas como, milho (*Zea mays*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), aveia (*Avena sativa*), cevada (*Hordeum vulgare*), choupo (*Populus spp.*) e girassol (*Helianthus annuus*) (Chen e Cutright, 2001; Dickinson e Pulford, 2005; Liphadzi *et al.*, 2003; Wenger *et al.*, 2002).

Tabela 1.2: Descrição das várias técnicas de fitorremediação. (adaptado de Ali *et al.*, 2013).

Técnica	Descrição
Fitoextração	Acumulação de poluentes na biomassa colhida i.e., caules
Fitofiltração	Sequestração de poluentes de águas contaminadas pelas plantas
Fitoestabilização	Limitação da mobilidade e biodisponibilidade de poluentes do solo pela acção de raízes
Fitovolatilização	Conversão de poluentes para a sua forma volátil e consequente libertação
Fitodegradação	Degradação de xenobióticos orgânicos por enzimas nos tecidos das plantas
Rizodegradação	Degradação de xenobióticos orgânicos na rizosfera por microorganismos

O sucesso da fitoextração depende da capacidade das plantas em produzir grandes quantidades de biomassa, assim como da capacidade da planta em translocar os metais para a biomassa aérea (Lofty e Mostafa, 2013). Um aspecto importante é a necessidade de colher as plantas antes da queda das folhas, ou antes da sua morte e decomposição, isto para evitar que os contaminantes retornem ao solo, ou se dispersem pelo ambiente envolvente.

A origem dos metais pesados no meio ambiente pode ser natural ou causada pelo homem. Como causas naturais surgem, a actividade vulcânica, a erosão, ou a decomposição das rochas-mãe. As fontes antropogénicas são muito diversas como por exemplo, a libertação de metais pesados através da actividade industrial, mineira, aplicação de pesticidas, fertilizantes e biosólidos na agricultura, etc. Este é um problema cada vez mais sério para o ambiente e para a saúde humana, pela perturbação dos ciclos biogeoquímicos e pela natureza não biodegradável dos metais pesados (grande susceptibilidade de bioacumulação). Sendo assim, a limpeza dos metais pesados do solo é absolutamente necessária, de modo a minimizar o impacto nos ecossistemas.

Quando absorvidos pelos seres vivos, os metais pesados, podem inibir vários metabolismos e afectar funções fisiológicas importantes, pela sua capacidade de combinarem com os grupos sulfureto existentes nas enzimas, muitas delas desempenhando funções vitais. Os iões de Cádmio, por exemplo, ligam-se facilmente às membranas celulares, podendo impedir os processos de transporte através da parede celular. Esta capacidade de se ligarem às proteínas favorece a bioacumulação no organismo ao longo do tempo, causando danos a médio/longo prazo e interferindo consequentemente, com a cadeia alimentar.

A toxicidade dos metais pesados depende ainda de outros factores, como a concentração, a duração e a frequência da exposição, assim como das circunstâncias em que esta ocorre (Manahan, 1997). O parâmetro DL_{50} , é o parâmetro que avalia a toxicidade aguda deste tipo de substâncias. Um metal pesado é mais tóxico, quanto menor for o seu DL_{50} e este parâmetro estatístico identifica a quantidade necessária de uma determinada substância tóxica, para levar à morte de 50% da população exposta ao poluente. O parâmetro NOAEL (No Adverse Observed Effect Level) indica a quantidade de substância administrada a um animal ($mg \cdot kg^{-1} \cdot dia^{-1}$), que não produz qualquer efeito nocivo, em termos de toxicidade crónica. Por exemplo metais pesados como o Cádmio e o Níquel, têm valores DL_{50} (rato) de $0.027 g \cdot kg^{-1}$ e $0,41 g \cdot kg^{-1}$ respectivamente (Singh *et al.*, 2003; McIntyre, 2003).

Os metais estudados neste trabalho são o cádmio e o níquel. O cádmio aparece associado a minérios de zinco, e o níquel a segregações magmáticas e a depósitos residuais da

meteorização. Mais de $2,2 \times 10^7$ kg de cádmio, foram libertados para o meio ambiente nas últimas cinco décadas, sendo considerado um metal não-essencial, esta libertação acarreta efeitos tóxicos em humanos, plantas e animais, mesmo com doses muito pequenas (Singh *et al.*, 2003; McIntyre, 2003).

1.2. *Miscanthus spp.*

O *Miscanthus* é uma planta com origem na zona oriental da Ásia e foi, numa primeira instância, introduzida na Europa como planta ornamental. Tem um elevado teor em lenhina e em fibra lenhocelulósica. Esta planta perene utiliza a via fotossintética C_4 e tem um ritmo de crescimento rápido, o que aliado à sua longa duração (20 a 25 anos) pode ser muito favorável à sua valorização, pois a planta pode ser cortada ao final de cada ano (Lewandowski *et al.*, 2003). A sua elevada produtividade poderá estar relacionada com os altos índices de eficiência na assimilação e uso de azoto e de água.

Outro aspecto positivo na utilização do *Miscanthus* para a produção de energia, é a sua resistência, tanto a pragas e a infestações, como a factores ecológicos adversos. Por exemplo, enquanto algumas espécies de *Miscanthus* crescem sob stress ambiental na zona de Taiwan, outras estão distribuídas pelo ambiente severo da Sibéria ou desde as Ilhas do pacífico às montanhas do Japão (Greef e Deuter, 1993). O facto de se ter desenvolvido em regiões do globo com grandes flutuações de temperatura entre o inverno e o verão, fez com que se desenvolvessem certas características como a resistência ao calor, à geada, à seca ou até a inundações. Contudo, as produtividades de biomassa dependem das diferentes espécies e genótipos, assim como do ambiente em que se desenvolveram.

Muitos estudos na Europa defendem que esta é a cultura com maior potencial de produção energética (MJ/ha) (Heaton *et al.*, 2008a; Sims *et al.*, 2006). É também considerada a cultura energética com maior eficiência energética, devido aos elevados rendimentos e ao baixo input energético (Glowacka *et al.*, 2011).

Modelos matemáticos como o MISCANMOD e o MISCANFOR, foram desenvolvidos de modo a prever o potencial energético do *Miscanthus*. Hastings *et al.* (2009), utilizando o modelo MISCANFOR, refere que esta espécie poderá fornecer 12% da energia necessária pela Europa em 2050 (isto se 35% da terra arável for direccionada para a plantação da cultura referida). Se nos E.U.A., 9,3% da terra fosse utilizada para a plantação de *M. x giganteus*, era produzida biomassa suficiente para a produção de 35 “billion gallons” de biocombustíveis. Tornam-se dados bastante interessantes quando comparados com as necessidades da culturas como o milho (24,4%) e a “switchgrass” (26,5%), de modo a atingir a mesma produção (Heaton *et al.*, 2008a).

Tabela 1.3: Características agronómicas das culturas energéticas mais utilizadas na Europa (Monti, 2014)

Características	<i>Miscanthus</i> Spp.	Sorghum bicolor	Arundo donax	Populus spp.
Produtividade (t MS ha ⁻¹)	15-30	5-30	14-45	7-28
Necessidade N (kg.ha ⁻¹)	0-100	56-224	40-60	110-450
Eficiência uso nutrientes	+++	++	+++	++
Reciclagem nutrientes	+++	+	+++	+++
Necessidades água (P _{mm})	700-800	300-700	380-650	>350
Eficiência no uso da água	+++	++	++	+
Resistência a pestes	+++	+++	+++	++
Capacidade invasiva	++	++	++	++
Benefícios ecológicos	+++	+++	+++	+++

A temperatura verificada no período de crescimento do *Miscanthus* tem um efeito significativo no rendimento da cultura, isto porque o seu mecanismo em C₄ é mais eficiente a elevadas temperaturas. No entanto, embora a maioria dos estudos defendam que esta espécie se desenvolve em praticamente toda a Europa com bons resultados, não está descrita uma temperatura de crescimento óptima, havendo sim uma forte ligação entre as condições e cada genótipo (El Bassam, 2010).

O seu sistema rizomatoso permite uma circulação sazonal dos nutrientes. Isto faz com que grande parte dos nutrientes no fim de cada ciclo vegetativo sofram translocação para a biomassa não aérea. Se a colheita da biomassa aérea for efectuada após senescência, a mesma irá conter menor quantidade de minerais sendo isto favorável à sua valorização energética. Este aspecto acarreta melhorias no que diz respeito aos impactes ambientais, é minimizada a adição externa de fertilizantes (McLaughlin *et al.*, 1996; Fernando, 2005) e aquando da sua combustão, são libertadas menores quantidades de poluentes (Lewandowski e Kicherer, 1997). A natureza perene confere à planta sistemas radiculares de grandes dimensões ao longo do ano o que faz com que seja mais resistente à erosão do solo e retenha nutrientes

mais eficientemente, prevenindo consequentemente a perda de azoto para as águas subterrâneas (Christian *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2001).

Liu (1989) e Xi (2000), defendem a existência de 23 espécies de *Miscanthus*, das quais se destacam três pelo seu potencial de valorização energética (*M. floridulus*, *M. sinensis* e *M. x giganteus*) e que serão estudadas neste trabalho, nos pontos 1.2.1.1., 1.2.1.2. e 1.2.1.3.

1.2.1. Biologia e Morfologia

1.2.1.1. *M. floridulus*

Este genótipo trata-se de uma planta perene robusta, de extrema importância em regiões com elevadas temperaturas, tais como as com ambiente tropical e subtropical. Nas referidas condições, a planta desenvolve-se através de densas aglomerações na sua base, atingindo alturas entre 2 e 4,1 m e um diâmetro basal de 8-10 mm (El Bassam, 2010). A base da folha deste genótipo de *Miscanthus* atinge comprimentos entre 30-100 cm e uma largura de 1,5 a 3,5 cm. As suas lígulas têm comprimentos significativos e são constituídas por diversas fímbrias de pequenas dimensões na sua parte superior. A panícula pode ter comprimentos na ordem dos 30-50 cm, tendo na sua constituição diversos filamentos (10-20 cm), sendo que o filamento central é o maior e mais robusto. O período de aparecimento e crescimento das suas flores, assim como da libertação de sementes, tendo em conta os factores edafo-climáticos a que a planta esteve sujeita (El Bassam, 2010).



O *M. floridulus* (figura 1.4) tem baixa tolerância a temperaturas reduzidas, quando comparado com os restantes genótipos descritos neste trabalho. Este genótipo está amplamente distribuído, por toda a China (apenas superado pelo *M. sinensis*). Diao *et al* (2011) e Li e Xia (2011), estudaram a diversidade genética do *M. floridulus*, concluindo ambos que esta é elevada, ainda assim são muito poucos os estudos existentes sobre este genótipo. A qualidade da biomassa, a resistência a doenças e a capacidade de adaptação a condições adversas, são aspectos a estudar para perceber melhor a possível valorização do referido genótipo.

Figura 1.4: *Miscanthus*

1.2.1.2. *M. sinensis*

O *M. sinensis* está amplamente distribuída na Ásia oriental. Em termos estruturais, é muito semelhante ao *M. floridulus*, isto porque existem diversas variantes entre o *M. floridulus* e o *M. sinensis*, provavelmente por cruzamento natural. Este tipo de *Miscanthus* cresce maioritariamente em encostas ou nas margens de campos de cultivo. O *M. sinensis* é caracterizado por caules finos (0,5-3,3m de altura e um diâmetro basal de 3-7mm), o que leva ao aumento da lixiviação de Cl e de K, mas ao mesmo tempo ao decréscimo do número de folhas (Jørgensen, 2010).

As suas folhas podem atingir comprimentos de 70 cm e larguras na ordem dos 1-2 cm. As suas lígulas são facilmente reconhecíveis, a sua panícula tem entre 10 a 25 filamentos 10-30 cm de comprimento, o filamento central é o de menores dimensões. As espiguetas encontram-se aos pares, uma maior e outra menor, com composições semelhantes e comprimentos na ordem dos 4-7 mm. As glumas têm dimensões semelhantes às espiguetas. Tanto a sua época de floração, como a libertação de sementes, se dão desde Julho a Dezembro (El Bassam, 2010).

Ao contrário do que acontece com o *M. floridulus*, o *M. sinensis* tem sido alvo de um maior número de estudos, sendo por isso melhor compreendida a sua natureza e as suas especificidades, como por exemplo ao nível da composição da parede celular de vários clones deste genótipo num estudo conduzido por Hodgson *et al.* (2010).

O estudo deste genótipo tem sido também alvo de interesse, pelas seguintes razões:

- Ter dado origem (pelo cruzamento com o *M. sacchariflorus*) ao *M. x giganteus* logo, compreender a planta mãe será útil para o desenvolvimento e melhoramento do híbrido em questão.
- Os clones de *M. sinensis* são mais tolerantes a geadas que os de *M. x giganteus* (Clifton-Brown e Lewandowski, 2000; Zub *et al.*, 2011);
- A sua maior produtividade em matéria seca, nos países Nórdicos quando comparada com o *M. x giganteus* (Jørgensen, 2010);
- A capacidade deste genótipo se desenvolver em zonas com climas diferentes, algumas com temperaturas muito baixas. Este aspecto torna interessante a compreensão dos genes que possam estar a permitir essa tolerância.



Figura 1.5: *Miscanthus sinensis*

1.2.1.3. *M. x giganteus*

Este é um híbrido natural do cruzamento de *M. sacchariflorus* com *M. sinensis*. Foi inicialmente introduzida na Europa como planta ornamental (Greef e Deuter, 1993). Os seus caules são finos mas difíceis de quebrar, com diâmetro de cerca de 10 mm e comprimentos na ordem dos 2 m, no primeiro ano de vegetação, e cerca de 4m, no segundo ano, isto na Europa, e 7-10 m na China (El Bassam, 1998). O menor comprimento no primeiro ano, deve-se à grande necessidade de nutrientes por parte do rizoma e das raízes, que canalizam grande parte da energia. Os rizomas constituem um sistema altamente ramificado de armazenamento de energia e as raízes chegam a penetrar o solo até um metro de profundidade. Este genótipo de *Miscanthus* atinge a maturidade passados 2 a 3 anos da sua plantação. A sua panícula é sensivelmente mais curta que as panículas do *M. sinensis* e do *M. floridulus*, tendo cerca de 15 cm. O seu período de floração é entre Setembro e Novembro, não produzindo sementes. Estas, quando produzidas, são estéreis fazendo com que as técnicas mais utilizadas para a sua propagação sejam, plantação dos rizomas, segmentação dos caules ou micropropagação/cultura de tecidos (Christian e Haase, 2001).

Em 1935, uma amostra de *M. x giganteus* proveniente do Japão, foi plantada na Dinamarca e percebeu-se que esta planta tinha a capacidade de se desenvolver com elevadas produtividades em ambientes com temperaturas baixas (Lewandowski *et al.*, 2000). Esta adaptação é possível pela contribuição dos genes do *M. sinensis*, enquanto que as especificidades do *M. sacchariflorus* permitem a adaptação do referido híbrido a ambientes mais quentes.

Esta planta cresce de 3 a 4m tem produtividades entre 10 e 30 t/ha (ano), dependendo das condições a que está sujeita (Clifton-Brown *et al.*, 2001).



Figura 1.6: *Miscanthus x giganteus*

1.2.2. Metabolismo

Tal como referido no ponto 1.2., o *Miscanthus* utiliza um mecanismo fotossintético em C_4 . As plantas que usam a referida via fotossintética são caracterizadas pelo uso eficiente de nutrientes, da água e da radiação (Ehleringer e Monson, 1993), sendo por isso constantemente apontadas como susceptíveis de valorização energética. A eficiência referida, reflecte-se ainda na capacidade das plantas C_4 , de se desenvolverem em ambientes que são severos para as plantas com mecanismo fotossintético em C_3 (de elevada salinidade e rochosos por exemplo) (Sage, 2004).

A via fotossintética em C_4 apresenta uma série de modificações anatómicas e bioquímicas com o objectivo de disponibilizar CO_2 em torno da enzima RUBISCO. Isto conduz a uma maior eficiência fotossintética, promovendo um decréscimo nas taxas de fotorrespiração (Kanai e Edwards, 1999).

No que diz respeito ao *Miscanthus*, Jørgensen (2010) relata que certos genótipos são mais tolerantes ao frio do que as plantas C_4 em geral e têm uma assimilação significativa de CO_2 a baixas temperaturas ($<15\text{ }^{\circ}C$). O mecanismo bioquímico que explica estas características é complexo e ainda não é totalmente compreendido. Contudo, Wang *et al.* (2008), demonstraram que a actividade da enzima (PPDK, envolvida na fixação do CO_2) decresceu quando as amostras de *Miscanthus* foram transferidas de $25^{\circ}C$ para $14^{\circ}C$. À medida que se deu uma estabilização da planta, os níveis da enzima subiram, chegando a obter-se

rendimentos em biomassa superiores aos verificados com 25°C (Wang *et al.*, 2008; Farage *et al.*, 2006).

O *Miscanthus* não possui duas das limitações mais comuns das C₄: elevado limiar de temperatura para o crescimento de folhas e susceptibilidade para inibição da fotossíntese a baixas temperaturas.

1.2.3. Propagação

A propagação desta espécie pode dar-se por sementes, por divisão, por segmentação dos caules ou dos rizomas, por micropropagação e por pré-cultivação seguida de transplantação.

Na Europa os métodos mais utilizados em culturas de *Miscanthus* têm sido a transplantação de plantas jovens ou de rizomas. De modo a que as plantas se desenvolvam normalmente são necessários alguns cuidados. O período de plantação é muito importante e vários estudos defendem que, que tanto as plantas jovens como os rizomas, devem ser plantados com uma temperatura de solo igual ou superior a 10°C (El Bassam, 2010). A humidade do solo moderada, terra cultivável e protecção das plantas contra geadas, são outros factores importantes para que a transplantação resulte no esperado.

De entre as técnicas referidas, a mais utilizada no estabelecimento e propagação dos *Miscanthus*, é a plantação directa dos rizomas (ou de parte deles, tendo a planta-mãe pelo menos 2/3 anos) no campo. Christian e Haase (2001) defendem que deverão ser plantados rizomas com mais de 20 cm de comprimento, de modo a aumentar a probabilidade de sobrevivência ao inverno, no primeiro ano.

No que diz respeito à técnica de propagação por segmentação dos caules, estes devem ser cortados entre o final de Julho e o final de Agosto, antes da florescência (El Bassam, 1998; Christian e Haase 2001). Os segmentos devem conter dois ou três nódulos, de preferência os primeiros do caule, uma vez que enraízam mais rapidamente. No entanto, para que as plantas sobrevivam ao inverno, pode ser necessária a preservação em estufa.

Um método mais recente, mas que tem sido alvo de uma forte aposta por diversas empresas na Alemanha, é a micropropagação/cultura de tecidos. Esta técnica baseia-se na remoção do tecido do meristema das secções apicais inflorescentes, de plantas de *Miscanthus* seleccionadas, o qual é depois desenvolvido em cultura (El Bassam, 1998; Christian e Haase, 2001). Este método tem, no entanto, uma desvantagem que pode ser limitante para todo o processo de produção. No primeiro ano as plantas micropropagadas podem não produzir reservas metabólicas suficientes para sobreviverem ao Inverno. Por outro lado, a facilidade de

scale-up do processo torna-o bastante atractivo para a comercialização, o que fez com que empresas como a Piccoplant (www.piccoplant.de/) e a Veba Oel (www.eon.com) unissem esforços de modo a tornar o método mais eficaz e por consequência com menores custos.

1.2.4. Factores Edafo-climáticos

O fenómeno de senescência das plantas é de grande importância pois é o processo que se dá aquando do envelhecimento e morte de uma planta, ou de parte dela. É um processo que se traduz na degradação coordenada dos compostos celulares (proteínas, lípidos e carboidratos), originando a mobilização dos nutrientes essenciais para o rizoma e raízes, onde são armazenadas. Isto faz com que, no caso do *Miscanthus*, a capacidade de sobrevivência de rizoma e raízes, seja de extrema importância para que, passado o inverno, a planta tenha as reservas de nutrientes suficientes para se desenvolver normalmente (Mos *et al.*, 2013). Ou seja, a senescência influencia, tanto o balanço como o conteúdo energético da cultura e um maior conhecimento sobre este fenómeno poderá facilitar a optimização do rendimento em biomassa e consequentemente, a qualidade do produto final pretendido (Lewandowski e Heinz, 2003).

Diversos estudos foram realizados com o intuito de perceber a tolerância ao frio dos rizomas de *Miscanthus*. Na Dinamarca, Irlanda e Alemanha, os rizomas não sobreviveram o inverno após plantação sendo até considerada como a principal desvantagens para a produção de *M. x giganteus* no norte da Europa. Um teste realizado na Alemanha, através de temperatura monitorizada, permitiu perceber que os rizomas de *M. x giganteus* morrem a temperaturas inferiores a -3,5 °C (Clifton-Brown e Lewandowski, 1998).

A eficiência do uso de água foi estimada entre 250 e 340 g.g⁻¹ (massa de água por unidade de biomassa seca, equivalente a litros de água por kg de matéria seca) e de 80 a 300 g.g⁻¹ para ensaios em campo, isto para o *M. x giganteus* (Beale *et al.*, 1999; Dressler, 1993). Apesar da eficiência do uso de água ser elevada em comparação com as culturas C₃, o crescimento é na maioria das vezes dependente de irrigação (Beale e Long, 1997).

A eficiência na utilização da radiação é, na maioria dos casos, superior do que a registada nas culturas C₃. Valores superiores a 3,29 g.MJ⁻¹ (matéria seca) foram registados no Reino Unido (Beale e Long, 1995) e em França (Tayot *et al.*, 1995), para o *M. x giganteus*. Na Holanda (Van der Werf *et al.*, 1993) e na Irlanda (Clifton-Brown *et al.*, 1996), provou-se que nem sempre a eficiência da fotossíntese em C₄ é mais eficiente (registados valores de 2,4 e de 2,6 g.MJ⁻¹, respectivamente).

No que diz respeito ao solo, factores como o pH, cor e textura, podem influenciar o crescimento e desenvolvimento do *Miscanthus*. Mesmo não sendo uma cultura muito exigente a este nível, vários estudos provam a sua capacidade de desenvolvimento em diversos tipos de solos, solos escuros e com texturas mais leves estão directamente relacionados com a taxa de crescimento da planta. O pH óptimo para o cultivo desta cultura perene situa-se entre 5,5 e 7,5 (Knoblauch *et al*, 1991).

1.2.5. Colheita, cultivo e armazenamento

De modo a obter biomassa com qualidade para combustão, por exemplo, é necessária a minimização do seu teor em humidade, cinzas, K, Cl, N e S. O atraso na colheita em três/quatro meses pode permitir tal decréscimo (Lewandowski *et al.*, 2003), mas por outro lado também reduz a produtividade em biomassa da cultura. A colheita deve ser efectuada pouco depois de terminar o inverno, em Fevereiro/Março, sendo este o período de maiores rendimentos em biomassa seca (superior a 80%) e uma altura em que a maioria dos nutrientes se encontram sequestrados nos rizomas.

A maquinaria utilizada na colheita deve ser usada cuidadosamente, com o objectivo de minimizar os riscos de danificar a estrutura dos rizomas e das raízes. Para um melhor manuseamento desta cultura são necessárias melhorias nos equipamentos de colheita estando em curso diversos estudos com esse objectivo.

Posteriormente à colheita, a biomassa deverá ser armazenada tendo em conta algumas condicionantes. O factor mais importante a ter em conta é o teor de humidade que, se for muito elevado, pode levar ao aumento da actividade microbológica que tem como consequência a contaminação do material (El Bassam e Huisman, 2001). El Bassam (1998), refere um teor de humidade máximo de 25%, para fardos de grandes dimensões, e 18% para fardos mais densos. O armazenamento pode ser feito em armazém ou ao ar livre (com ou sem cobertura), sendo que no segundo caso pode existir o risco de maior humidade na parte superior da pilha de *Miscanthus* (El Bassam e Huisman, 2001).

A secagem da biomassa é também muito importante, pois vai permitir, ou não, atingir o teor de humidade que permita a estabilização da biomassa e o seu posterior armazenamento e/ou processamento e utilização. Existem vários métodos de secagem:

- Secagem em campo - a mais atractiva economicamente;
- Ventilação mecânica em armazém - boa opção quando o teor de humidade da biomassa colhida é elevado;

- Secadores artificiais – tambores rotativos, secadores em banda, pneumáticos, a vapor, por compressão ou em leito fluidizado.

O processamento dos *Miscanthus* pode envolver a formação de fardos, ou a compactação em pellets, briquettes ou “wafers” (El Bassam, 1998).

1.2.6. Produção

Para que a produção de uma cultura de *Miscanthus* se desenvolva de modo a atingir produtividades elevadas, têm de ser levadas em conta as características da planta, tendo presente que cada variante de *Miscanthus* possui especificidades muito próprias no que diz respeito às condições de cultivo.

De um modo geral, a plantação da cultura deve ser efectuada quando as temperaturas do solo são superiores a 10°C, isto para evitar as geadas características da primavera. No entanto, não deverá ser demasiado tardia, de modo a garantir o normal desenvolvimento das plantas. Um outro aspecto a ter em conta é a densidade de plantação, Clifton-Brown *et al.* (2001) observaram que esta afecta significativamente a produtividade, nos primeiros dois/três anos de cultivo. O limiar de temperatura para que haja desenvolvimento das folhas, nas plantas que iniciaram o seu crescimento, é entre 5 e 10°C (Clifton-Brown e Lewandowski, 2000).

Após plantação, os novos rebentos emergem rapidamente, sendo que o crescimento é lento até Maio/Julho. A sua natureza C₄ faz com que se desenvolva melhor no Verão, verificando-se o crescimento dos caules até 1,5-2 m, no primeiro ano, e até 4 m nos anos seguintes (El Bassam, 1998). Em países com temperaturas mais elevadas, como no Sul da Europa, o *Miscanthus* completa o seu ciclo de crescimento em Agosto/Setembro, após florescência. Findo o ciclo, há circulação dos nutrientes para o rizoma e os caules começam a lenhificar, a planta começa a secar e a senescência da cultura é acelerada. No centro e norte da Europa o cenário é diferente, a plantação mais tardia torna o período de crescimento da cultura mais curto. Como consequência as plantas podem não florir e os caules podem não lenhificar totalmente, tornando mais provável o perigo de derrubes pela acção do vento (Fernando, 2005; Fernando e Oliveira, 2005). Neste sentido tornou-se necessário o desenvolvimento de técnicas de estabelecimento da cultura mais fiáveis, ou através do desenvolvimento de novos genótipos, com maior capacidade de sobrevivência ao inverno para que as taxas de crescimento da planta sejam mais altas. Assim, a planta conseguirá acumular reservas metabólicas suficientes no rizoma, que lhe permitem não só a sobrevivência ao

inverno, mas também o crescimento das plantas na primavera seguinte (Christian e Haase, 2001; Clifton-Brown *et al.*, 2001).

Outro aspecto importante é a aplicação de fertilizantes de modo a suportar o bom crescimento da cultura. O *Miscanthus*, tal como referido no ponto 1.2., não necessita de elevadas aplicações de fertilizantes externos. Long e Beale (2001) defendem que a planta utiliza inicialmente os nutrientes armazenados no rizoma e só depois as fontes externas logo, a aplicação de fertilizantes, exceptuando o primeiro ano da plantação de modo a não se verificarem perdas por lixiviação, não deve ser efectuada logo quando os rebentos iniciam o seu crescimento. O mesmo estudo refere que os fertilizantes podem ser aplicados sob a forma líquida ou granulada, quando a planta atinge os 30-40 cm de altura.

Campos de estudo na Áustria, Alemanha e Grécia, mostraram que o *M. x giganteus* não mostra resposta significativa à fertilização de N, a partir do segundo e terceiro ano de plantação (Lewandowski *et al.*, 2000). A quantidade óptima que foi definida como suporte básico para o desenvolvimento do sistema rizomatoso, foi de 60 kg/ha (Greef, 1995). Neukirchen (1995) demonstrou que, no final do inverno, rizomas com seis anos de idade, continham 265 kg N e 235 kg K ha⁻¹. Na primavera, estas reservas são mobilizadas para os rebentos, fazendo do *Miscanthus* parcialmente independente da reserva de N do solo (Christian *et al.*, 1997). Ensaio de laboratório com o isótopo ¹⁵N, demonstraram que apenas 38% de ¹⁵NH₄ ¹⁵NO₃ dos 60 kg/ha N fornecidos, foram utilizados pela planta, dos quais metade se encontrava no rizoma (Christian *et al.*, 1997). A grande parte do N da planta não provém da fertilização, mas sim da mineralização e deposição do solo. Posto isto, o mesmo estudo concluiu que é necessária fertilização de N, maioritariamente em solos com baixo teor em N. A premissa de que, a necessidade de azoto do *Miscanthus* é baixa para atingir rendimentos máximos de biomassa, é aceite pela comunidade científica quando comparado com outras culturas.

De modo a haver uma protecção da qualidade e do bom desenvolvimento da cultura de *Miscanthus*, é necessário um controlo das ervas-daninhas que se encontram no local. No primeiro ano da plantação, o *Miscanthus* compete de uma maneira ineficaz com este tipo de ervas. A partir do segundo ano, não é necessário o controlo das ervas-daninhas.

A produção desta espécie tem certos riscos associados, sendo uma das questões que levanta mais polémica na comunidade científica, a qualificação desta espécie como invasiva (ou não). Diversos estudos com o *M. sinensis* na Europa (Pysek *et al.*, 2002; Jørgensen, 2010), demonstraram que o potencial invasivo da referida cultura é uma preocupação real. Nos E.U.A., esta planta foi introduzida como ornamental mas hoje em dia já se encontra distribuída por diversas zonas do país, sendo qualificada como invasora. Na Dinamarca, não foi observado

alastramento significativo, no entanto isto pode estar relacionado com as baixas temperaturas características do norte da Europa que afectam a quantidade de sementes produzidas.

O risco de incêndio é também algo a ter em conta aquando da produção desta cultura. O risco torna-se significativo principalmente durante o período de senescência da cultura e também em climas secos. Uma possibilidade de o reduzir, é a realização da colheita ser efectuada antes da maturação ser completamente atingida. Uma colheita antecipada pode ser favorável quando a cultura é direccionada para a produção de bioetanol ou biogás (Uellendahl *et al.*, 2008), pois o seu teor em lenhina é menor (Hodgson *et al.*, 2010).

Um estudo para avaliar o risco invasivo de três culturas perenes distintas, foi realizado nos E.U.A.. O *Arundo donax* e o *Panicum virgatum* foram rejeitados, enquanto que o *M. x giganteus* obteve uma classificação de “aceitável” (Barney e Ditomaso, 2008). O resultado muito se deverá à produção de sementes estéreis por parte deste híbrido, tal como pelo alastramento dos seus rizomas, que não é considerado significativo (cerca de 10 cm/ano). Por exemplo, os rizomas de *M. sacchariflorus* podem atingir vários metros em poucos anos (Jørgensen, 2010).

Quanto às doenças que afectam esta cultura energética, não existe conhecimento de nenhuma em particular que limite de uma maneira significante a sua produção (El Bassam, 1998; Christian e Haase, 2001). Ainda assim, é conhecida a susceptibilidade do *Miscanthus* ao *Fusarium* (Thinggaard, 1995), ao “Barley Uelw Dwarf Luteovirus” (Christian, 1994) e à *Leptosphaeria sp.* (O'Neill e Farr, 1996). Na tabela 1.4 estão compilados os benefícios, riscos e propostas para contrariar os mesmos, na produção de *Miscanthus*.

Tabela 1.4: Benefícios, riscos e propostas para contrariar os mesmos, na produção de *Miscanthus*

Benefícios	Riscos	Maneira para minimizar riscos
Alta produtividade	Possibilidade de incêndio	Colheita prematura – maior teor de humidade
Tolerância ao frio		
Resistência a pestes e doenças		Programas de monitorização
Poucas perdas de nutrientes	Aumento do uso de água	Restrições na localização/produção pra reduzir o uso de água
Retenção de C no solo		
Baixas emissões de GEEs		
<i>M. x giganteus</i> não é invasiva	<i>M. sinensis</i> é invasiva	Produção direccionada para a esterilidade da cultura

1.2.6.1. Produtividade

Vários estudos têm vindo a ser realizados ao longo dos anos com o intuito principal de perceber qual a produtividade máxima de *Miscanthus*. A análise de muitos dos resultados obtidos pela comunidade científica permitiu que Srtullu *et al.* (2011), afirmasse que a produtividade máxima de *Miscanthus* é atingida entre o terceiro e o quarto ano de cultivo, com produtividades entre as 28-30 t.ha⁻¹ ano. Os dados obtidos através do modelo matemático MiscanMOD, corroboram com o estudo realizado por Srtullu *et al.* (2011). O modelo calculou que a planta tem produtividades de 10/30 t.ha⁻¹ ano, crescendo 3-4 m (Clifton-Brown *et al.*, 2001).

Contudo, os dados das produtividades variam consideravelmente de acordo com o local e respectivo clima. No contexto Europeu, as produtividades mais elevadas são obtidas nos países do Sul como Portugal, onde se registam valores superiores a 30 t.ha⁻¹ (matéria seca), com irrigação. No sul de Itália foram obtidos valores superiores a 26 t.ha⁻¹.ano⁻¹, assim como na Grécia, ambos os dados referentes ao 3º ano de cultivo. No Norte da Europa, os valores decrescem mas a ausência de irrigação é um factor que tem de ser levado em conta. Estudos na Dinamarca e Alemanha obtiveram um limiar de produtividades entre 10 e 25 t.ha⁻¹.ano⁻¹.

Clifton-Brown *et al.* (2000), com o MiscanMOD, explorou a capacidade produtiva do *Miscanthus* no estado do Illinois (E.U.A.). As projecções apontam para valores de 27/44 t.ha⁻¹ ano, mas após três anos do estabelecimento da cultura a produtividade de biomassa aérea ultrapassou os 60 t.ha⁻¹. Diversos ensaios de investigação validaram as estimativas do modelo e sugerem que o MiscanMod é aplicável em grande parte da Europa.

No Japão, dados de vários genótipos de *M. sinensis*, apontam para produtividades próximas de 10 t/ha. Existem grandes variações nos valores reportados neste país, desde 4-6 t.ha⁻¹ (Iwaki *et al.*, 1964) a valores superiores a 21 t.ha⁻¹ (Yamane *et al.*, 1958), explicado pelas diferenças geográficas entre os campos de cultivo.

Na China, mais propriamente na região de Wuhan, foram avaliadas e comparadas as produtividades de 23 diferentes tipos de *Miscanthus*. No primeiro ano de cultivo, foi obtida produtividade máxima de apenas 2,22 t.ha⁻¹, enquanto que no segundo ano se verificou um crescimento significativo, sendo 22.76 t.ha⁻¹, o valor máximo (Yu *et al.*, 2013).

1.2.6.2. Valorização

Tal como referido anteriormente, o *Miscanthus* é uma cultura muito promissora no que diz respeito à sua valorização, não só energética mas de diversas formas. Segundo El Bassam (2010), a densidade energética de *Miscanthus* é $18,2 \text{ MJ.kg}^{-1}$. A biomassa de *Miscanthus* contém baixo teor em cinza e em azoto, tornando-a susceptível de utilização como matéria-prima na produção de calor, electricidade, fermentação para biocombustíveis, gasificação e liquefacção (El Bassam, 2008). Segundo Fernando e Oliveira (2005), a produção de energia que pode ser obtida através da combustão da biomassa produzida por hectare pelas plantas de *Miscanthus*, em Portugal, é equivalente a 9000 L de gasolina, 10000 L de diesel ou a 14,5 t de carvão.

A composição química da biomassa afecta a eficiência de conversão da biomassa em energia ou em produtos químicos, pelo que será positivo a sua colheita utilização após senescência (Klinke *et al.*, 2004). A qualidade da biomassa para combustão depende fortemente da minimização dos teores de humidade, cinza, K, Cl, N e S. Um estudo orientado por Lewandowski e colaboradores em 2003 demonstrou que o atraso da colheita é favorável à melhoria da qualidade de combustão da biomassa de *Miscanthus*, através do estudo de diversos genótipos na Europa desde a Suécia a Portugal.

Embora tenha alguns aspectos negativos como o baixo ponto de fusão das cinzas (prejudicial a alguns sistemas de combustão), as características de combustão desta cultura energética são favoráveis quando comparadas com outros cereais (Lewandowski e Kicherer, 1997). Na Dinamarca o *Miscanthus* foi utilizado, com sucesso, à escala comercial. Foi efectuado um processo de co-combustão (50% *Miscanthus*/50% carvão), numa caldeira de leito fluidizado circulante – 78 MW (Visser e Pignatelli, 2001). No Reino Unido, a Central Energética a biomassa de 35 MW, de Sutton Ely, perto de Cambridge, tem acordos com os produtores para queimar não só a palha de cereais mas também *Miscanthus* (Fernando, 2005). No verão de 2010, esta central (maior do mundo a utilizar palha), estava a ser alimentada com mistura 50:50 de palha e *Miscanthus* (Jørgensen, 2010).

No caso da produção de electricidade, um estudo baseado nos modelos de Clifton-Brown e Lewandowski (2000) para o estado do Illinois (E.U.A.), defende que caso esta fosse produzida através da co-combustão de *Miscanthus*/carvão (50/50), iria prevenir a emissão de 39 milhões de toneladas de CO_2 para a atmosfera.

A cultura de *Miscanthus* também tem sido estudada em ensaios de gasificação e pirólise, como por exemplo, nos trabalhos de Khelfa *et al.* (2009), de De-Jong *et al.* (1999) e de Yorgun e Simsek (2008), como biocombustível de segunda geração para a produção de etanol

(Sorensen *et al*, 2008; Hayes e Hayes, 2009) e na produção de Hidrogénio (De-Vrije *et al.*, 2002).

No contexto de independência dos combustíveis fósseis nos E.U.A., Heaton *et al.* (2008b) defende que a utilização de *Miscanthus* para a produção de bioetanol, é uma alternativa viável às culturas de milho utilizadas neste país. Segundo este estudo o *Miscanthus* pode fornecer mais de 260% de etanol por hectare do que o milho. Esta substituição tem um aspecto importantíssimo, que é a não competição com o mercado alimentar.

Tanto para a produção de bioetanol como de biogás a partir de *Miscanthus*, é necessário a aplicação de um pré-tratamento à biomassa para que os açúcares fiquem mais disponíveis e consequentemente haja melhoria no rendimento do processo. Um pré-tratamento possível, e já utilizado com grande sucesso, é a oxidação húmida em que a biomassa é tratada, a elevadas temperaturas e pressões na presença de oxigénio ou ar (Uellendahl *et al.*, 2008).

A composição macromolecular do *Miscanthus*, mais especificamente o seu elevado teor em celulose, faz com que seja possível a valorização desta cultura através da produção de pasta de papel. Esta produção é possível depois de a biomassa ser sujeita a uma série de processos químicos, dos quais o processo ao sulfato (Kraft) tem sido o mais utilizado, ainda que tenham vindo a ser desenvolvidos e melhorados novos métodos. Visser e Pignatelli (2001) defendem mesmo que, o papel produzido a partir de *Miscanthus* é de elevada qualidade, apresentando propriedades semelhantes à pasta proveniente do eucalipto.

Na China, uma fábrica na localidade de Yueyang, em Hunan, utiliza o *Miscanthus* numa mistura com ~25% de pinheiro para produzir pasta para papel desde 1965, produzindo cerca de 120 t.d⁻¹ (Visser e Pignatelli, 2001).

A partir de *Miscanthus* foram também isolados diversos compostos fenólicos de valor acrescentado para indústrias como a alimentar, farmacêutica e cosmética (Parveen *et al.*, 2008). São diversos compostos com propriedades distintas como, anti-oxidantes, anti-inflamatórias, anti-cancerígenas, anti-HIV, aditivos e conservantes para alimentos, entre outros (Machado *et al.*, 2008; Ou e Kwok, 2004). Mais de 20 compostos fenólicos foram identificados de entre os quais, ácido cafeico (usado na indústria farmacêutica pelas suas propriedades anti-oxidantes) que foram os metabolitos encontrados em maior abundância nos tecidos de *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* e de *M. x giganteus* (Parveen *et al.*, 2008). Isto pode ser um factor muito importante para a valorização deste tipo de biomassa no contexto de biorrefinaria.

Para a utilização e valorização dos materiais lenhocelulósicos no contexto de biorrefinaria é necessário o seu fraccionamento, pois só assim será possível aproveitar ao máximo cada um dos componentes. Esta é uma abordagem interessante pois, através de pré-

tratamentos, os componentes estruturais do *Miscanthus* (celulose, hemicelulose e lenhina) poderão ser extraídos separadamente de modo a serem alvo de valorização. A celulose, tal como referido anteriormente, pode ser usada para a produção de pasta para papel, a hemicelulose por exemplo, pode ser utilizada para a produção de xilitol e a lenhina para a produção de biopolímeros, fibras ou compostos fenólicos para utilização nas indústrias (farmacêutica e alimentar).

A viabilidade da utilização de *Miscanthus* na produção de pellets foi também testada, sendo que o seu elevado teor em lenhina é o principal aspecto negativo a afectar o processo (Lehman *et al.*, 2012). Este estudo concluiu que o *Miscanthus* pode ser utilizado na produção de pellets, mas em conjunto com outros materiais (0,20 kg.kg⁻¹), resultando em pellets de qualidade para o uso doméstico.

1.2.6.3. Utilização de *Miscanthus* na fitorremediação de substratos contaminados com metais pesados

Neste ponto serão descritos uma série de estudos realizados com o *Miscanthus*, onde a capacidade de fitorremediação de substratos contaminados com metais pesados desta cultura energética, foi avaliada.

O crescimento do *Miscanthus* em terrenos altamente contaminados tem vindo a ser cada vez mais estudado, tendo sido utilizados contaminantes muito variados.

Esta cultura perene foi utilizada na fitorremediação de solos provenientes da actividade mineira, muito ricos em arsénio (As), chumbo (Pb) e antimónio (Sb). Os resultados apresentados pela equipa de Wanat *et al.* (2013), demonstram uma clara redução da biomassa aérea, mas sem implicações significativas na actividade fisiológica e no desenvolvimento da planta. Concluíram que a planta estudada (*M. x giganteus*) tem a capacidade de crescer em solos altamente contaminados e que pode ser utilizada como fitoestabilizadora, a curto-prazo.

Metais pesados, como o Cd e o Cr, foram utilizados por Arduini *et al.* em estudos realizados em separado (2004 e 2006). Foram aplicadas concentrações entre 0 e 3 mg.l⁻¹, para o Cd, e entre 50 e 200 mg.l⁻¹ para o Cr. Referem que com níveis de toxicidade moderados, as plantas demonstraram capacidade de remover ambos os metais, crescendo normalmente. No caso do Cd, o crescimento da biomassa aérea foi influenciado e os resultados apontam para a possibilidade de remoção, em culturas de 50 g.ha⁻¹ pela colheita da biomassa aérea, e de 100 g.ha⁻¹ pela colheita dos rizomas. No que diz respeito às contaminações com Cr, o crescimento é inibido com a aplicação de concentrações superiores a 150 mg.l⁻¹ e concluíram ainda que, o teor de azoto absorvido, o ritmo de translocação para a biomassa aérea e o azoto total na

biomassa decrescem, com a redução do crescimento das plantas, ou seja, com o aumento da concentração de Cr.

Terrenos contaminados com Cd, Cu, Pb e Zn, provenientes de precipitação atmosférica, foram utilizados num estudo de comparação entre uma cultura de *Miscanthus* e culturas anuais como controlo, com o intuito de perceber o impacto das diferentes culturas, na disponibilidade dos metais nos solos envolventes. Iqbal (2012), conclui que a disponibilidade de Cu e Pb decresceu, que Cd também ficou menos disponível nos solos mas defendem que apenas com um estudo a médio/longo prazo poderão ter certezas deste facto. Contrariamente aos metais referidos, a disponibilidade de Zn não decresceu nos solos onde o *Miscanthus* estava plantado em comparação com as culturas anuais.

O estudo de Fernando *et al.* (2004), indica que o estabelecimento e propagação de plantas de *Miscanthus*, jovens ou numa fase madura, em solos contaminados com lamas ricas em metais pesados e a posterior fitorremediação desses campos, constitui uma possibilidade viável. As lamas, fonte de contaminação estudada, disponibilizaram para o meio uma elevada quantidade de matéria mineral, que foi removida e acumulada na planta. Essa acumulação foi mais expressiva nas raízes e rizomas do que na biomassa aérea. Para as doses de lamas aplicadas (correspondentes a metade, ao valor e ao dobro da deposição máxima permitida por lei), não se verificaram fenómenos de fitotoxicidade. Esta biomassa pode ainda ser valorizada economicamente, como material destinado à produção de energia ou à produção de pasta para papel, uma vez que a aplicação da contaminação não influenciou a qualidade da biomassa aérea.

O estudo de Fernando e Oliveira (2004), no qual se pretendeu estudar o desenvolvimento da planta face à contaminação do solo por alguns metais pesados individualizados, indica que as plantas de *Miscanthus* são mais sensíveis à contaminação com Cd, Cu e Hg do que à contaminação com Ni, Pb, Zn e Cr.

Hartley *et al.* (2009), estudou a mobilidade de arsénio (As) em solos contaminados pela presença industrial, com a adição de compósitos orgânicos e de biocarvão. O crescimento de *Miscanthus* não teve influência significativa na mobilidade de As, mas deste estudo conclui-se que esta C.E. pode crescer em campos com este tipo de contaminação, embora com produtividades um pouco mais baixas. O grupo liderado por Hartley recomenda cautela na aplicação deste tipo de processo, principalmente quando pode haver potencial contaminação de águas subterrâneas. Nota ainda para o uso dos compósitos orgânicos, que aumentaram significativamente a produtividade da C.E.

O uso de *Miscanthus* no tratamento de solos contaminados com PAH (Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), tem vindo a ser estudado. Estes são compostos

orgânicos hidrofóbicos provenientes da queima de matéria orgânica e de combustíveis fósseis, apresentam sérios riscos de toxicidade para os seres vivos. Estudos de Técher e colaboradores (2010 e 2012), confirmam a capacidade do *M. x giganteus* em crescer neste tipo de solos contaminados. Os resultados demonstram a adaptação fisiológica a concentrações de PAH entre 26 e 364 mg.kg⁻¹. Houve uma melhoria global na qualidade do agronômica do solo e referem a necessidade de mais tempo de estudo para perceber se a rizorremediação é viável.

Foi avaliada a capacidade fitoestabilizadora do *Miscanthus* em terrenos contaminados com a chamada “lama vermelha”, proveniente da indústria de alumínio. Foram estudadas as variações na distribuição de Cd, Zn e Pb, a disponibilidade de metais pesados nos solos e a capacidade de absorção dos metais em questão, pelo *Miscanthus*. Como consequência, foi avaliada, e confirmada, a sua capacidade de crescer normalmente com este tipo de exposição. As conclusões deste estudo são interessantes pois, referem um decréscimo da concentração de metais pesados nos solos, na presença da “lama vermelha”, e ainda referem a capacidade de absorção dos metais por parte dos tecidos da planta. O risco de lixiviação de metais pesados para camadas de solo inferiores e para águas subterrâneas, foi reduzido.

Na China, a existência de águas altamente contaminadas é uma realidade. Uma variante de *M. sinensis* foi usada na remediação de águas eutrofizadas, através de sistemas de plantas flutuantes. Um método inovador que obteve resultados interessantes na remoção de nutrientes pela planta em questão (Huang *et al.*, 2013).

1.3. Objectivos do trabalho

Sendo necessário promover, como medida prioritária, uma transição para um sistema energético mais diversificado e deste modo assegurar um desenvolvimento sustentável e a proteção do meio ambiente, as culturas energéticas (C.E.) enquadram-se como um substituto viável às fontes de energia não renováveis, tais como os combustíveis fósseis. Para além de permitir a conservação da água potável, a produção de C.E. com recurso a águas residuais, permite o tratamento de efluentes nocivos e pode diminuir os custos de todo o processo (Sims e Riddell-Black, 1998; Zalesny *et al.*, 2009). A junção dos processos de fitorremediação e de irrigação com águas residuais, pode ser vista como de interesse ambiental significativo, pois preservam a estrutura e a textura natural do solo, e do ponto de vista económico pois pode gerar grandes quantidades de biomassa (Varma, 2004).

O presente estudo teve como principal objectivo avaliar a capacidade de fitorremediação de águas residuais contaminadas com Cd e Ni por três genótipos de *Miscanthus* (duas espécies - *Miscanthus sinensis* e *Miscanthus floridulus*, e um híbrido – *Miscanthus x giganteus*). A resposta do *Miscanthus* a este tipo de irrigação foi avaliada através

da análise do crescimento e qualidade da biomassa, ao mesmo tempo que se estudou a capacidade de fitorremediação do sistema planta-solo.

As águas residuais, neste caso efluentes de suinicultura, quando aplicadas em solos podem fornecer nutrientes às plantas ao mesmo tempo que permitem uma melhoria da qualidade dos solos aumentando o seu teor em matéria orgânica e diminuindo a necessidade de fertilizantes. Os metais pesados estudados neste trabalho são o Cádmio e o Níquel. O cádmio é um contaminante de alta importância por exemplo, nos Estados Unidos da América é considerado como o segundo metal com maior importância enquanto poluente ambiental (Salt *et al.*, 1998). Mais de $2,2 \times 10^7$ kg de cádmio, foram libertados para o meio ambiente nas últimas cinco décadas, sendo considerado um metal não-essencial, esta libertação acarreta efeitos tóxicos em humanos, plantas e animais, mesmo com doses muito pequenas (Singh *et al.*, 2003; McIntyre, 2003). O níquel é um nutriente essencial para o normal desenvolvimento da planta e um componente chave de certas enzimas envolvidas no metabolismo e fixação biológica do azoto.

Este estudo surge com a necessidade de desenvolver uma área de investigação que até hoje tem sido pouco, ou nada estudada. A capacidade do *Miscanthus* na fitorremediação de solos contaminados com metais pesados (Fernando, 2005; Wanat *et al.*, 2013) abre portas a um futuro promissor nesta técnica, que pode vir a ser fulcral em termos ambientais e energéticos.

2. Parte Experimental

Sendo o objectivo principal do presente trabalho, a avaliação da capacidade de fitorremediação de *Miscanthus*, foram analisadas duas espécies (*Miscanthus sinensis* e *Miscanthus floridulus*) e um híbrido (*Miscanthus x giganteus*), sujeitos a irrigação de efluentes de suinicultura contaminados com cádmio (0,2 mg/L) e níquel (2 mg/L), tendo em conta os valores limite de emissão na descarga de águas residuais em Decreto-Lei (DL 236/98).

Pretendeu-se, com estes ensaios, alcançar os seguintes objectivos:

- Analisar o efeito da contaminação dos solos com metais pesados (Cd e Ni) no crescimento, na produtividade e na qualidade da biomassa dos *Miscanthus*;
- Determinar a eficiência da fitorremediação, expressa em termos da remoção dos metais pesados dos solos;
- Estudar o comportamento dos metais pesados nos solos;
- Caracterizar as águas de percolação, de modo a avaliar possíveis riscos de contaminação das mesmas.

Os três genótipos referidos foram colocados em vasos com um diâmetro de 0,28 m (0,0616 m²) juntamente com 12 kg de solo retirado da área envolvente do Edifício IX da FCT/UNL. A adubação dos vasos foi desenvolvida tendo em conta o descrito por El Bassam (2010) e foram utilizados os seguintes compostos: nitrolusal (3g N/m²), ureia (3g N/m²), sulfato de potássio (17g K₂O/m²) e superfosfato simples (23g P₂O₅/m²) – Todos os adubos utilizados foram obtidos na empresa ADP – Adubos de Portugal S.A.:

- P – Superfosfato simples, contendo 18% de P₂O₅
- K – Sulfato de potássio, contendo 51% de potássio (K₂O)
- N – Nitrolusal 26, uma mistura homogénea de nitrato de amónio e de carbonato de cálcio, contendo 27% de azoto (N) e 12,8% de cálcio (CaO)
- Ureia – Contendo 46% de N.

Os rizomas dos três diferentes genótipos de *Miscanthus* foram fornecidos pelo Departamento de Ciências da Produção Agrária e Alimentar da Universidade de Catânia (Itália) tendo sido colocados dois rizomas por vaso em abril de 2012. Em janeiro de 2013 foi efetuada a primeira colheita e consequente análise das plantas findo o primeiro ciclo vegetativo, coincidindo com o término de uma tese de mestrado com o título “Efeito da aplicação de Águas Residuais na produtividade e na qualidade de três genótipos de *Miscanthus*”.

No referido trabalho, os vasos agora irrigados com águas residuais de Cd e Ni, estavam sujeitos à rega de efluentes ricos em zinco (10 mg/L) e cobre (1 mg/L), respectivamente. Após

o corte (janeiro de 2013), as plantas foram irrigadas com água da rede do campus da FCT/UNL durante um mês (final de janeiro e início de Fevereiro), antes de se fazer a transição para a rega com Cd e Ni (que coincidiu com o início do crescimento dos *Miscanthus* nos vasos, a partir dos rizomas).

Deu-se então início ao presente trabalho. Todos os vasos foram irrigados com cerca de 950 mm por ano da água residual correspondente (efluente de suinicultura + metal pesado). Simultaneamente realizou-se um ensaio com vasos contendo solo mas sem plantas para avaliar a o efeito do sistema solo-plantas, em detrimento do sistema solo. Foram utilizados vasos controlo contendo as três variantes de *Miscanthus*, também com adubação NPK mas irrigados apenas com água da rede do campus da FCT/UNL, para comparação. Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.1. Métodos Analíticos

2.1.1. Caracterização físico-química e biológica das águas residuais e das águas de percolação

As águas residuais utilizadas no presente trabalho foram obtidas numa suinicultura da região de Rio Maior. Os efluentes referidos foram contaminados com cádmio (0,2 mg/L, utilizando uma solução salina de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e níquel (2 mg/L, utilizando uma solução salina de $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), que tal como referido no ponto 2., são os valores limite de emissão na descarga de águas residuais (Decreto-Lei, DL 236/98).

Um estudo criterioso das ARs e da água de torneira é fundamental, para que se possa avaliar se todos os parâmetros se encontram dentro dos limites legais. Assim sendo, os métodos utilizados para avaliar essas mesmas especificidades de ambas as ARs e da água de torneira, estão enunciadas e descritas na Tabela 2.1. (todos os métodos foram aplicados às ARs e água da torneira, excepto, a Carência Bioquímica de Oxigénio, CBO, que só foi aplicada nos percolados).

Foram efectuadas duas recolhas distintas de percolados, uma primeira em Março de 2013 e uma segunda recolha após corte das plantas (Janeiro 2014). Todos os percolados recolhidos foram guardados em frascos de plástico (1000 mL) e posteriormente filtrados por filtros de membrana (porosidade de 0,45 μm). Até se procederem a todas as análises de caracterização físico-química, as amostras foram conservadas segundo a Norma ISO 5667-3 (1985).

Com a realização das análises referidas na Tabela 2.1., podemos não só perceber a capacidade de fitorremediação dos três diferentes genótipos, como também a possibilidade de

aproveitamento das águas residuais para a irrigação deste tipo de plantas. Ajudará a perceber a capacidade de retenção de metais por parte do solo, comparando a primeira recolha com a segunda.

Tabela 2.1; Métodos analíticos utilizados na caracterização físico-química das águas de irrigação e dos percolados.

Parâmetros	Breve descrição do método analítico
pH	Eletrometria (APHA <i>et al.</i> , 1985). O aparelho de pH foi previamente calibrado com duas soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.
Condutividade	Determinação através de um condutímetro (ISO 7888, 1985).
Azoto Amoniacal	Destilação e posterior titulação do destilado com HCl 0,02 N. (ISO 5664, 1984).
Nitritos, Nitratos (Palintest, Ltd)	Redução dos nitratos a nitritos, por contacto do extracto filtrado com pó de zinco. Determinação dos nitritos por espectrofotometria de absorção molecular, através da formação de um complexo corado vermelho-púrpura, pela combinação do ácido sulfanílico diazotado com NED (ISO 6777, 1984; Jenkins <i>et al.</i> , 1996).
Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO₅)	Determinação do consumo de oxigénio dissolvido após 5 dias de incubação a 20°C, ao abrigo da luz, com adição de um inibidor da nitrificação (ISO 5815-1,2).
Oxidabilidade	Oxidação por reacção com permanganato de potássio a elevadas temperaturas, em meio ácido, da matéria orgânica presente nas amostras. Determinação do permanganato consumido pela adição de excesso de oxalato, seguindo-se a titulação com permanganato de modo a obter o resultado final (ISO 8467, 1993).
Fosfatos	Determinação dos fosfatos por espectrofotometria de absorção molecular, através da formação de um complexo corado com uma solução de molibdato de amónio, na presença de ácido ascórbico, tartarato de potássio e antimónio (Watanabe e Olsen, 1965; ISO 6878-1, 1986).
Pb; Zn; Cu; Ni; Cr; Cd; Mn; Fe; Ca; Na; Al; Mg; K	Determinação dos metais, por espectrofotometria de absorção atómica. Ca e Mg de acordo com a ISO 7980 (1986). Na e K de acordo com a ISO 9964 (1993). Ni, Cu, Zn e Pb pela norma ISO 8288 (1986), quando foi utilizada a chama. Fe e Mn com chama, de acordo com os "Standard Methods" da APHA <i>et al.</i> (1985). Cd pela norma ISO 5961 (1994). Cr pela norma ISO 9174 (1990).

2.1.2. Metodologias analíticas aplicadas às plantas

Neste ponto encontram-se descritas as metodologias aplicadas às plantas, recolhidas em Janeiro de 2014, de modo a caracterizar as mesmas. Foram determinados parâmetros biométricos tais como, altura do caule, área foliar, diâmetro basal, distância entre nós e número de folhas. A composição química e as produtividades de cada componente da biomassa, tendo em conta o vaso em que se efectuou o ensaio, foram também determinadas.

Os parâmetros biométricos foram analisados, logo após o corte e colheita das plantas. A altura dos caules (nível do solo até ao topo do caule) e a distância entre nós, foram medidos com recurso a uma fita métrica. A área foliar foi determinada num aparelho especializado para o efeito, Li-3100C Area Meter da marca LI-COR Biosciences e consequentemente calculada pela equação 1 (Eq. 1). O diâmetro basal de cada caule, foi calculado através de um paquímetro digital.

$$\text{Índice de Área Foliar (cm}^2\text{.cm}^{-2}\text{)} = \frac{\Sigma \text{Área Foliar por vaso}}{\text{Área do vaso}} \quad (\text{Eq. 1})$$

A produtividade da biomassa aérea (folhas, caules, panícula, biomassa não *Miscanthus* e manta morta) foi calculada, após corte das plantas, para cada um dos seus componentes e para o seu todo. Cada componente da planta foi pesado em separado, de imediato (peso húmido) e posteriormente depositados numa estufa de vácuo devidamente identificados, a 40°C durante 48h de modo a obter o peso seco dos componentes em questão findo o referido período.

A equação 2 permite calcular as produtividades, expressas em g.m⁻², para os diferentes componentes referidos em cima:

$$\text{Produtividade (g.m}^{-2}\text{)} = \frac{\text{Peso seco da componente da planta (g)}}{\text{Área do vaso (m}^2\text{)}} \quad (\text{Eq. 2})$$

A produtividade aérea total foi calculada através da soma das diferentes partes, ou seja, das produtividades dos diferentes componentes da planta. Os métodos analíticos utilizados para a caracterização da biomassa recolhida, estão enunciados e descritos na Tabela 2.2. A determinação do número de plantas por m² (em cada vaso), permite-nos uma extrapolação da densidade populacional, podendo ser um parâmetro importante de comparação do comportamento dos 3 diferentes genótipos à contaminação de Cd e Ni.

Tabela 2.2: Métodos analíticos utilizados na caracterização físico-química da biomassa recolhida.

Parâmetros	Breve descrição do método analítico
Humidade	Perda de peso após secagem a $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (2 h), repetida até peso constante (AOAC, 1990).
Cinzas	Resíduo mineral obtido após incineração a $550 \pm 50^{\circ}\text{C}$ (3 h) (AOAC, 1990).
Azoto Total	Método Kjeldahl: Mineralização com H_2SO_4 , destilação e titulação do destilado com H_2SO_4 0,02N (Watts e Halliwell, 1996).
Fósforo Total	Digestão a quente com HNO_3 e H_2SO_4 (Watts e Halliwell, 1996). Determinação dos fosfatos no digerido, por espectrofotometria de absorção molecular, através da formação de um complexo corado com uma solução de molibdato de amónio, na presença de ácido ascórbico e de tartarato de potássio e antiamónio (Watanable e Olsen, 1965)
Ni; Cd;	Mineralização das amostras por via seca (incineração em mufla a $550 \pm 50^{\circ}\text{C}$) e dissolução das cinzas com ácido nítrico (Vandecasteele e Block, 1993). Determinação dos metais, nos extractos, por espectrofotometria de absorção atómica.

2.1.2.1. Determinação dos polissacáridos e da lenhina

O método utilizado para a caracterização da matéria-prima resultante dos ensaios Controlo, ArCd e ArNi, baseia-se na hidrólise ácida quantitativa. Para tal, foram pesadas 0,5 g de amostra para um tubo de ensaio aos quais se adicionaram 5 mL de H_2SO_4 72% (p/p) sendo esta mistura incubada a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$, num banho termoeletrificado (Memmert, Alemanha) durante 1 h e agitada ocasionalmente com uma vareta de vidro.

Todo o conteúdo do tubo de ensaio foi de seguida transferido para frascos Schott de 250 mL através do arrastamento com água desmineralizada, numa quantidade suficiente para se obter uma concentração de H_2SO_4 de 4% (p/p). Esta mistura foi autoclavada a 121°C durante 1 h (Autoclave AJ Costa, Portugal) e no final deste período foi feito um arrefecimento rápido com a abertura do esgoto da autoclave. Depois de arrefecidos, os frascos foram pesados para verificar possíveis perdas durante o tratamento. A mistura foi filtrada em cadinhos de vidro com placa porosa (porosidade 3) previamente tarados a 550°C numa mufla (Heraeus D-6450, Alemanha) durante cerca de 5 h.

A fração líquida resultante foi filtrada por filtros $0,22 \mu\text{m}$ e analisada em HPLC (conforme descrito em 2.4.9.) Os cadinhos contendo a fração sólida foram lavados com 100 mL de água, secos a 100°C (Memmert, Alemanha) durante 16 h. O resíduo seco é considerado

lenhina Klason, após correção da cinza determinada por incineração das amostras numa mufla a 550 °C durante 5h.

O cálculo das percentagens dos polímeros e grupos acetilo é feito com base nas concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético presente na amostra encontra-se descrito no Anexo I.

2.1.2.2. Doseamento de monossacáridos e ácido acético

D-glucose, D-xilose, L-arabinose e ácido acético, foram analisados por HPLC utilizando uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, EUA). Para os compostos referidos foi utilizado um HPLC Agilent 1100 Series System (EUA) equipado com detetor de IR sendo as análises realizadas nas condições operacionais indicadas na Tabela 2.3.

Todas as amostras foram previamente filtradas através de filtros Millipore® com um diâmetro de poro de 0,22 µm.

As concentrações dos compostos analisados foram calculadas a partir de curvas de calibração traçadas a partir de soluções padrão. Estes padrões foram diariamente analisados.

Tabela 2.3: Condição de análise para a coluna cromatográfica HPX-87H

	Amostras
Fase Móvel	H ₂ SO ₄ 5 mM
Caudal	0,4 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 µL
Temperatura da coluna	50°C

2.1.3. Metodologias aplicadas aos solos

A análise dos solos foi efectuada a todos os ensaios realizados uma única vez, antes do corte das plantas, em Dezembro de 2013. De modo a obter uma amostra homogénea, foram recolhidas amostras de cada um dos vasos, representativas do perfil superior (colhidas a uma profundidade de 0-20 cm) e do perfil inferior (colhidas a 20-40 cm), com o auxílio de um Auger. As amostras foram misturadas para cada tipologia de contaminação, espécie de *Miscanthus* e perfil de solo.

De modo a estudar as especificidades das amostras de solo recolhidas, foram aplicados diversos métodos, descritos na tabela 2.4. Todos os métodos foram realizados através da amostra seca (durante 4h a uma temperatura de 75°C numa estufa), excepto a determinação do pH, da condutividade e do teor de humidade, que foram realizados usando as amostras húmidas. Todas as amostras, depois de secas, foram armazenadas em frascos de plástico até serem realizadas as consequentes análises (Dyckhoff *et al.*, 1996).

A determinação e interpretação destes parâmetros é fulcral, de modo a perceber de que modo se comportaram os solos na presença dos *Miscanthus* quando sujeitos a irrigação com ARs, no caso dos ensaios, comparando estes resultados com os obtidos no controlo e nos vasos sem planta. A relação metal-solo será assim alvo de estudo.

Tabela 2.4: Métodos analíticos utilizados na caracterização físico-química dos solos recolhidos

Parâmetros	Breve descrição do método analítico
Humidade	Perda de peso após secagem a $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (4h), repetida até peso constante, expressa em relação à amostra húmida (NP 84, 1985).
Carbono Orgânico	Método Walkey-Black (Walkley e Black, 1934)
pH	Determinação por potenciometria através com o auxílio de um eléctrodo de vidro, numa suspensão de terra em água destilada na razão de 1/2,5 (Baize, 2000).
Condutividade	Determinação efectuada com um condutivímetro, numa suspensão de terra em água destilada na razão de 1/2,5 (Baize, 2000).
Ni; Cd;	Digestão com água-régia de acordo com a Norma ISO 11466 (1995). Determinação dos metais, no digerido, por espectrofotometria de absorção atómica.

2.1.4. Equipamentos e análise estatística dos resultados

Os equipamentos utilizados para as diferentes análises descritas nos pontos, 2.1.1, 2.1.2 e 2.1.3, foram:

- Para a “condutividade” – condutivímetro (METTLER TOLEDO – InLab 730 Conductivity);
- Para “nitritos e nitratos” – espectrofotómetro de absorção molecular (Interface Photometer 7000);
- Para “azoto amoniacal” e “azoto total” – destilador e digestor Kjeltex System 1002 Distilling Unit Tecator;
- Para “fósforo total” e “fosfatos extraíveis” – espectrofotómetro de absorção molecular (Shimadzu Spectrophotometer UV-120-11) a 880 nm;
- Para a leitura dos metais – espectrofotómetro de absorção atómica (SOLAAR Thermo Electron Corporation M Series) com chama correspondente às necessidades do metal em questão.

Os modelos matemáticos usados para o tratamento estatístico dos resultados obtidos foram:

- ✓ Modelo ANOVA – que visa avaliar a análise da variância, dependendo do número de factores e do número de amostras de populações que se pretende estudar.
- ✓ Teste t: duas amostras com variâncias desiguais – teste utilizado de modo a determinar se é provável que as duas amostras em estudo resultem de distribuições com médias de população iguais.

3. Resultados e Discussão

3.1. Caracterização da água residual e da água da rede do Campus da FCT-UNL

De modo a caracterizar as águas utilizadas na irrigação dos ensaios em estudo, foram realizadas uma série de análises físico-químicas (tabela 3.1/3.2) que tornam possível o conhecimento criterioso das propriedades das águas em questão. Os resultados obtidos foram comparados com o Decreto-lei nº 236/98, desenvolvido para a “protecção da saúde pública, da gestão integrada dos recursos hídricos e da preservação do ambiente”, para que se possa avaliar se todos os parâmetros se encontram dentro dos limites legais.

Tabela 3.1: Parâmetros físico-químicos da água residual e da água da rede do Campus da FCT-UNL, usadas na irrigação dos ensaios

	Água Residual	Água da rede
pH	6,85±0,07	6,32±0,00
Condutividade (mS/cm)	0,51±0,017	0,445±0,00
Oxidabilidade (mg/L O₂)	9,6±2,4	0,08±0,08
Azoto amoniacal (mg/L N)	4,62±1,32	<0,14
Nitritos (mg/L N)	0,017±0,006	0,030±0,003
Nitratos (mg/L N)	6,78±2,41	5,50±0,08
Fosfatos (mg/L P)	0,75±0,09	0,042±0,002

Os resultados obtidos para a água residual estudada (tabela 3.1), provenientes de suinicultura contaminadas com Cd e Ni (tabela 3.2), têm de ser analisados tendo em conta a legislação dos anexos XVI e XVIII (DL 236/98), que legislam a qualidade das águas destinadas à rega e os valores limite de emissão na descarga de águas residuais, respetivamente. Tendo em conta o anexo XVI, todos os resultados se encontram dentro dos trâmites legais para o VMR, exceptuando para o caso da concentração dos metais em estudo na respectiva água residual (Cd e Ni). Da tabela 3.2, onde estão os resultados obtidos para o teor de metais (mg/L) nas águas residuais contaminadas com Cd e Ni, podemos verificar que no caso do Ni foi obtida uma concentração de 1,92±0,20 mg/L na ArNi, valor superior ao VMR de 0,5 mg/L, mas inferior ao VMA de 2,0 mg/L. No que diz respeito ao Cd o valor obtido de 0,18±0,02 mg/L na ArCd é superior ao VMA de 0,05 mg/L, sendo considerado um risco “dado este ião se acumular nas plantas e no solo, podendo prejudicar o ser humano” (Anexo XVI do DL 236/98).

No que diz respeito ao anexo XVIII, todas as análises efectuadas a ambas as águas residuais, resultaram em valores inferiores ao VLE para a descarga destes efluentes.

Relativamente à água da rede do *Campus* da FCT-UNL, o único valor que não vai de encontro aos valores admitidos, é valor de pH que se encontra abaixo do legislado para o VMR ($6,5 \leq \text{pH} \leq 8,4$). Os restantes parâmetros encontram-se de acordo com a legislação, Anexo XVI, DL 236/98.

Tabela 3.2: Teor de metais (mg/L) nas águas residuais contaminadas com Cd e Ni e água da rede

	Água da torneira	ArCd	ArNi
Cd	<0,032	0,18±0,02	<0,032
Ni	<0,063	<0,063	1,92±0,20
Pb	<0,10	<0,10	
Cr	<0,05	<0,05	
Zn	0,101±0,043	0,274±0,005	
Cu	0,057±0,031	0,131±0,039	
Fe	0,052±0,002	0,055±0,013	
Mn	<0,029	<0,029	
Al	<0,34	<0,34	
Ca	38,5±0,4	43,5±13,5	
Mg	6,59±0,13	7,05±1,35	
K	37,3±3,7	17,8±7,2	
Na	49,4±8,6	44,0±13,1	

3.2. Caracterização das águas de percolação

Na tabela 3.3 apresentam-se os valores médios dos parâmetros obtidos na caracterização físico-química das águas de percolação para os vasos em estudo, irrigados com água da rede (Controlo) e irrigados com água residual rica nos metais pesados, Cádmio (0,2 mg/L Cd) e Níquel (2 mg/L Ni). Os valores apresentados nos vasos com plantas são referentes à média dos resultados obtidos nos três genótipos pois não se verificaram diferenças de qualidade nas águas de percolação obtidas entre genótipos. Excepção feita para a condutividade, que será descrita em baixo.

Tabela 3.3: Qualidade físico-química das águas de percolação

Parâmetros		Controlo	ArCd	ArNi
pH	Com plantas	7,67±0,54	8,10±0,14	6,94±0,15
	Sem plantas	7,47±0,09	7,13±0,07	7,39±0,09
Condutividade (mS/cm)	Com plantas	2,33±1,17	2,28±0,83	1,89±0,94
	Sem plantas	0,50±0,12	0,85±0,22	0,98±0,36
Nitritos (mg/L N)	Com plantas	0,019±0,013	0,798±0,547	1,51±1,41
	Sem plantas	0,041±0,007	1,66±0,05	10,77±0,27
Nitratos (mg/L N)	Com plantas	0,194±0,083	2,72±0,80	3,28±0,78
	Sem plantas	0,352±0,085	44±19	63±15
Ortofosfatos (mg/L P)	Com plantas	1,46±0,56	0,180±0,118	0,228±0,147
	Sem plantas	0,035±0,008	0,128±0,096	0,097±0,065
Oxidabilidade (mg/L O₂)	Com plantas	8,53±2,57	29,3±7,0	20,5±8,4
	Sem plantas	2,4±0,09	16,0±2,2	13,6±1,5
Azoto Amoniacal (mg/L N)	Com plantas	<0,14	2,24±1,61	4,58±2,47
	Sem plantas	<0,14	<0,14	<0,14
CBO₅ (mg/L O₂)	Com plantas	0	4±1	3±0
	Sem plantas	0	3±1	1±0

Os valores obtidos para o pH das águas de percolação, não apresentam diferenças estatísticas significativas. Embora os resultados não tenham significado estatístico, o pH parece ter tendência a ficar mais alcalino ao ser irrigado com a ArCd e por outro lado, mais ácido ao ser irrigado com ArNi, quando comparados com o Controlo.

Na condutividade não se verificam diferenças significativas entre contaminações mas sim entre as espécies em estudo. Os percolados recolhidos nos ensaios de *M. sinensis* destacam-se como os maiores valores de condutividade, para os três tipos de contaminação (valor $p=0,0399$; ANOVA ArCd; valor $p=0,0355$; ANOVA ArNi). Esta diferença pode ser explicada pela menor produtividade registada neste genótipo, resultando em maiores perdas por percolação. As famílias de *M. x giganteus* e *M. floridulus*, tiveram comportamentos semelhantes no que diz respeito aos valores de condutividade, nas condições a que foram sujeitas. Embora não tendo significado estatístico, os resultados obtidos para os ensaios Controlo e ArCd, são ligeiramente superiores aos calculados para os ensaios ArNi.

Os resultados do presente estudo vão de encontro ao estudado por Zema *et al.* (2012), que observou valores similares, entre águas residuais e controlo, para a condutividade (2,2 a 2,3 dS m⁻¹) e para o pH (7,6 a 7,7), também sem diferenças estatísticas significativas.

Em relação aos nitritos, por comparação com a água de rede utilizada na irrigação, constatou-se que o valor aumentou. Este aumento pode dever-se à ocorrência de lixiviação de

compostos azotados presentes no solo devido à sua fertilização (tabela 3.1 e 3.3). Verificou-se, igualmente, que a rega com águas residuais elevou os teores de nitritos nos percolados. Atendendo a que as AR's não apresentam um valor em nitritos muito elevado, face à água da torneira, estes nitritos podem resultar de processos de redução dos nitratos presentes nas AR's ou de processos oxidativos do azoto amoniacal presente em elevada quantidade no efluente.

Quando comparados os valores de nitratos das águas de percolação com as águas de irrigação, verifica-se uma diminuição significativa dos vasos controlo em relação à água de rede, funcionando o solo como um meio de retenção destes iões, tal como acontece para os vasos irrigados com água residual (tabela 3.1 e 3.3). Verificam-se diferenças estatísticas significativas entre as contaminações "Controlo" e "ArNi", onde se obteve um valor $p=0,0194$ (ANOVA), sugerindo clara influência deste nível de contaminação na concentração final de nitratos nos percolados. Para as restantes combinações, os resultados não possuíram significado estatístico. Ainda assim, de notar a diferença de resultados entre as contaminações "Controlo" e "ArCd".

O teor de ortofosfatos presente nas águas percoladas foi analisado neste ponto, pois este macronutriente essencial ao desenvolvimento das plantas, pode ser encontrado nas águas residuais, sendo os fosfatos muito mobilizáveis do solo para as águas. O fósforo é um dos nutrientes responsáveis pela eutrofização da água. Quanto aos resultados, não são registadas diferenças estatísticas significativas quer entre genótipos, quer entre contaminações, ainda assim de notar, o teor elevado para o Controlo ($1,46 \pm 0,56$ mg/L P) em relação aos teores registados para os ensaios irrigados com as águas residuais contaminadas ($0,180 \pm 0,118$ mg/L P - ArCd; $0,228 \pm 0,147$ mg/L P – ArNi). O *Miscanthus* mostrou uma propensão para absorver e reter o ião fosfato, o que de acordo com o que acima foi descrito, será um benefício do ponto de vista ambiental.

Para oxidabilidade e CBO_5 , são registados valores inferiores para os ensaios irrigados com água da rede embora esses resultados não possuam significado estatístico, ainda assim de realçar a diferença obtida. Isto pode identificar o importante papel da biomassa na remediação das águas residuais contaminadas com os metais em questão.

O azoto amoniacal não foi detectado nos vasos controlo e na água da torneira. No caso das águas de percolação dos vasos irrigados com água residual rica em Cd e Ni verificou-se uma remoção significativa por comparação com a água residual que é utilizada na rega. Esta remoção pode significar a retenção do azoto amoniacal pelas raízes da planta e posterior utilização do nutriente. Este é um efeito benéfico pois limita a lixiviação deste poluente para os lençóis freáticos.

As tabelas 3.4 e 3.5 exibem o teor de Cd/Ni nas águas de percolação colhidas em Janeiro. Esta é uma importante análise de modo a avaliar a capacidade de fitorremediação do sistema *Miscanthus*-solo, em reter o Cd/Ni das águas residuais, de modo a prevenir a contaminação das águas subterrâneas aquando da irrigação de campos com estas águas.

As águas de percolação obtidas a partir dos ensaios irrigados com a ArCd e a ArNi, apresentam um maior teor de Cd e Ni, respectivamente, do que os ensaios Controlo (Figura 3.4 e 3.5).

A percentagem de remoção, no caso da irrigação com a água residual contaminada com Cd, foi significativa (98-99%), mas não se observaram diferenças estatísticas significativas entre os três genótipos de *Miscanthus*. De acordo com os resultados obtidos, observa-se então capacidade fitorremediadora de cádmio pelo *Miscanthus*, ou seja, entre 88% a 96% do cádmio fornecido na irrigação foi removido pelo consórcio planta-solo, apesar de não se terem observado diferenças significativas entre o solo, o sistema planta-solo e os três genótipos de *Miscanthus* em estudo (tabela 3.4).

Tabela 3.4: Teor de Cádmio nas águas de percolação (mg Cd/L)

	<i>M. x giganteus</i>	<i>M. sinensis</i>	<i>M. floridulus</i>	Sem plantas
Controlo	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032
ArCd	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032

A remoção de Ni verificada em *M. x giganteus* e *M. sinensis* (96-98%) é significativamente mais elevada que para a família de *M. floridulus*, que denotou uma remoção de apenas 58% do Ni presente no sistema planta-solo (tabela 3.5).

Tabela 3.5: Teor de Níquel nas águas de percolação (mg Ni/L)

	<i>M. x giganteus</i>	<i>M. sinensis</i>	<i>M. floridulus</i>	Sem plantas
Controlo	<0,063	<0,063	<0,063	<0,063
ArNi	0,079±0,012	<0,063	0,942±0,358	<0,063

3.3. Caracterização da Biomassa

3.3.1. Parâmetros Morfológicos e de Produtividade

3.3.1.1. Altura do Caule

De modo a estudar o bom desenvolvimento dos três genótipos em estudo, foram analisados diversos parâmetros morfológicos das plantas tal como, a altura do caule. Sendo o caule o componente responsável pelo suporte e pelo transporte de diversos elementos essenciais ao normal desenvolvimento da planta (Whiting *et al.*, 2011), este é um parâmetro muito importante a estudar, pois permite-nos avaliar a capacidade de crescimento nas condições a que a mesma esteve sujeita durante o estudo.

Na tabela 3.6 estão apresentados os resultados da altura média dos caules dos três diferentes genótipos de *Miscanthus*, sujeitos às irrigações indicadas. *M. x giganteus* e *M. floridulus* foram os genótipos com um crescimento mais acentuado, tendo sido verificada a altura média mais elevada, de 225 cm, no *M. x giganteus* quando utilizada água da rede como irrigação. A diferença acentuada entre o referido valor e os resultados obtidos para ambas as irrigações de AR com metais pesados pode indicar a ocorrência de fitotoxicidade. Este resultado difere do defendido por Wanat (2013), que refere uma elevada resistência deste genótipo à toxicidade de metais pesados.

O crescimento observado para *M. sinensis* e para *M. floridulus* foi uniforme entre os três diferentes tipos de irrigação, indicando a ausência de fitotoxicidade. Neste estudo não se verifica o contributo das águas residuais para um maior crescimento da planta, contrariamente ao defendido por Zema *et al.* (2012) ainda assim, observa-se um desenvolvimento normal e saudável nos três diferentes genótipos como será comprovado pelos resultados expostos no restante deste ponto.

Tabela 3.6: Altura média dos caules (cm)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	225±9	136±12	126±13
<i>M. sinensis</i>	72±39	70±22	68±24
<i>M. floridulus</i>	172±28	154±20	191±23

Procedeu-se à interpretação estatística dos resultados, em termos da significância das variações registadas (Análise de variância - ANOVA) e teste t, no final do ciclo vegetativo, entre os níveis de contaminação e entre as espécies de *Miscanthus*, recorrendo-se ao programa Excel.

Verificam-se diferenças estatísticas significativas, tanto entre os diferentes tipos de irrigação (valor $p=0,0011$; ANOVA), como entre os diferentes genótipos em estudo (valor

$p=1,9E-11$; ANOVA) para este parâmetro. Sendo assim, o teste t é utilizado para perceber quais as diferenças em concreto ao estudar a interação e comportamento de cada genótipo com cada tipo de contaminação. Verifica-se que os genótipos *M. x giganteus* e *M. floridulus*, se comportam de maneira idêntica (valor $p=0.6385$; teste t), enquanto que o *M. sinensis* demonstra diferenças estatísticas significativas quando estudado com os genótipos referidos. No caso concreto do *M. sinensis* não são detectadas diferenças entre contaminações, ao contrário dos dois restantes genótipos, o que se pode verificar principalmente pelos valores obtidos para o *M. x giganteus*.

De notar um crescimento em todos os genótipos no segundo ano vegetativo em comparação com o primeiro, estando este resultado de acordo com El Bassam (2010), que defende que o *Miscanthus* apresenta um ritmo de crescimento inferior no primeiro quando comparado com os ciclos vegetativos seguintes. Registaram-se alturas superiores na ordem dos 50 cm, em média. Para o *M. x giganteus* (controlo) foi registado cerca do dobro da altura média do primeiro ano.

Os resultados registados no presente trabalho para os três genótipos estão, de uma forma geral, de acordo com as alturas dos caules verificadas por Zub *et al.* (2011) – valores também relativos ao segundo ano de estabelecimento da cultura - realçando uma vez mais a inexistência de influência negativa das águas residuais na produtividade. Pela comparação dos resultados de ambos os trabalhos verifica-se a natureza diplóide do genótipo *M. sinensis* em estudo.

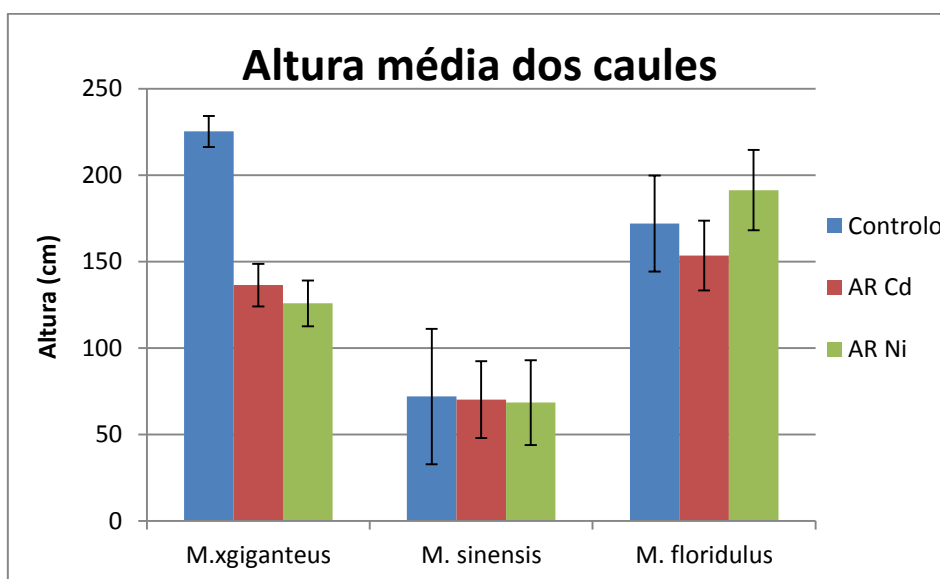


Figura 3.1: *Altura média dos caules*

O diâmetro dos caules é um parâmetro biométrico a ter em conta pois, de uma perspectiva biomecânica, este deve ser suficientemente elevado de modo a assegurar a

estabilidade da planta (Niklas, 1998). Uma boa relação entre o diâmetro do caule e a altura da planta faz com que esta se torne mais resistente a factores adversos como o vento ou a precipitação, diminuindo efeitos negativos como, o curvar da planta ou o levantamento das raízes e/ou rizomas (King e Loucks, 1978; Sterck e Bongers, 1998). Para além do referido, um estudo criterioso das propriedades biomecânicas dos caules de *Miscanthus*, pode permitir o avanço na investigação das tecnologias de colheita e de armazenamento (Liu *et al.*, 2012). Tal como se verificou na altura média, também no diâmetro médio dos caules se registou um aumento significativo tendo em conta o primeiro ciclo vegetativo, principalmente nos *M. x giganteus* e *floridulus*, enquanto que no caso do *M. sinensis* o aumento do diâmetro médio foi menor (cerca de 1 mm).

O valor mais elevado foi verificado no *M. floridulus* (11,72 mm), neste genótipo parece existir uma influência positiva da irrigação com AR através da comparação dos resultados de ArCd e ArNi, com o Controlo. No híbrido *M. x giganteus* verificou-se o oposto, em que os resultados das AR foram inferiores ao do controlo, sobretudo o da ArNi com uma redução de cerca de 2 mm em relação ao Controlo.

Tabela 3.7: Diâmetro médio dos caules (mm)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	7,41±0,96	6,18±1,03	5,46±0,77
<i>M. sinensis</i>	3,52±0,59	3,45±0,88	3,28±0,73
<i>M. floridulus</i>	8,78±1,35	9,67±2,54	11,7±1,3

Contudo, o tratamento estatístico revela diferenças estatísticas significativas entre espécies de *Miscanthus* (valor $p=6E-12$; ANOVA), enquanto que entre tipos de irrigações as diferenças calculadas não são significativas. Para os diferentes genótipos, em particular no caso do *M. x giganteus* e do *M. floridulus*, de realçar as diferenças estatísticas significativas entre os ensaios controlo e os ensaios ArNi dos mesmos - valor $p=0,0245$; teste t e valor $p=0,028$; teste t, respectivamente. Estas diferenças significativas são comprovadas pela análise da figura 3.5, onde se denota um efeito positivo das águas residuais para o *M. floridulus* e um efeito negativo para o *M. x giganteus*.

Tal como verificado para a altura dos caules, também neste parâmetro se verificam resultados idênticos aos obtidos pela equipa liderada por Zub em 2011.

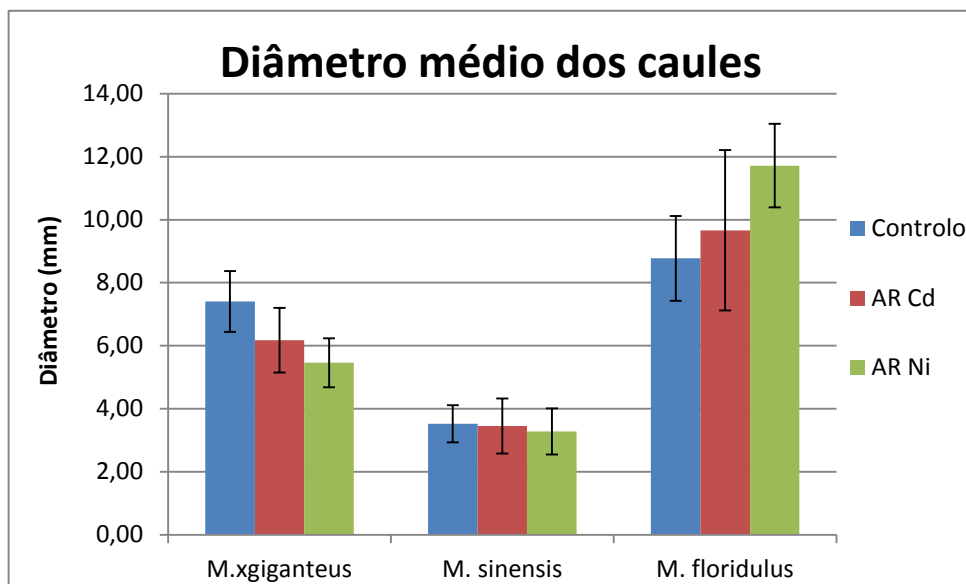


Figura 3.2: Diâmetro médio dos caules

De seguida são apresentados os resultados (tabela 3.8) para o parâmetro biométrico que estuda a distância média entre o 2º e 3º nó dos caules. Esta análise é um importante factor para o desenvolvimento de novos métodos de colheita de *Miscanthus*, que sendo um dos passos mais dispendiosos de todo o processo de valorização desta cultura energética, o torna num parâmetro fulcral. A dureza dos caules de *Miscanthus* nos dois primeiros nós, é duas vezes superior à dureza verificada entre o terceiro e o sétimo nó (Liu *et al.*, 2012).

O resultado mais elevado é de 17,38 cm e o mais reduzido de 6,88 cm, para os genótipos *M. x giganteus* (Controlo) e *M. sinensis* (ArNi), respectivamente. A família do *M. x giganteus* apresentou as plantas com maior distância média entre o 2º e 3º nó. Contudo, a diferença entre o controlo e o verificado nas águas residuais parece ser significativa, tal como verificado nos resultados para a altura média dos caules.

Tabela 3.8: Distância média entre 2º e 3º nó (cm)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	17,4±2,4	13,4±2,8	11,5±3,8
<i>M. sinensis</i>	7,90±1,4	8,70±1,8	6,88±1,2
<i>M. floridulus</i>	9,60±0,4	8,55±0,5	7,15±1,1

Através da aplicação do ANOVA, chega-se à conclusão que há diferenças significativas a nível estatístico entre espécies e entre níveis de contaminação. O teste t indica a ausência de diferenças estatísticas significativas entre as espécies, *M. sinensis* e *M. floridulus* (valor $p=0,3051$). Para estes genótipos não são verificadas diferenças entre as contaminações, enquanto para o *M. x giganteus*, o valor p obtido de 0,013, revela diferenças significativas entre os ensaios Controlo e os ensaios irrigados com a água residual contaminada com Ni.

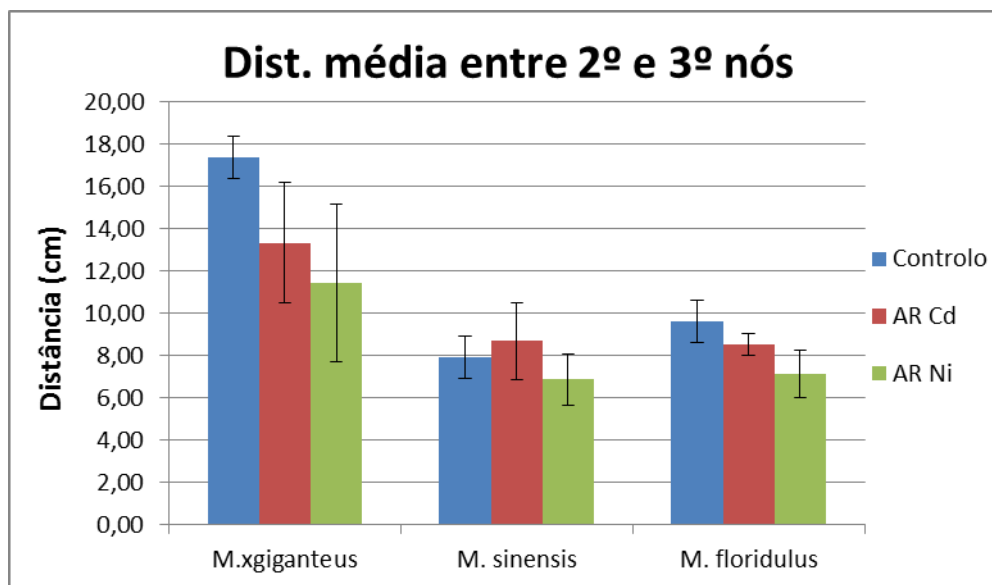


Figura 3.3: Distância média entre 2º e 3º nó (cm)

3.3.1.2. Número de Caules por m²

O número de caules por m², também um parâmetro indicador da qualidade do desenvolvimento da planta, apresenta resultados interessantes. Os resultados dão a entender uma proporcionalidade inversa aos resultados para a altura média dos caules ou seja, nas famílias de plantas (e consequentes irrigações) onde são registadas alturas médias mais baixas, obtém-se um maior número de caules por m². Como é no caso do *M. sinensis*, em que a altura média máxima obtida é de 72 cm (Controlo) e o número médio de caules por m² com a utilização da ArCd é o resultado máximo detectado neste parâmetro, de 276 caules/m².

Os resultados expostos na tabela 3.9, demonstram uma influência positiva da irrigação com águas residuais contaminadas com metais pesados no aumento da densidade populacional (nº de caules/m²), excepção feita para o caso do *M. floridulus* irrigado com a ArNi. Contudo, o tratamento estatístico revela que os três genótipos se comportam de maneira diferente às condições a que foram sujeitos (valor $p=1E-18$; ANOVA). Apenas no caso do *M. x giganteus*, os dados obtidos pela aplicação do teste t vão de encontro ao defendido anteriormente, onde o valor $p=0,039$ demonstra a existência de diferenças estatísticas significativas entre o Controlo e ArNi. Nas restantes combinações não se verificam diferenças significativas.

Tabela 3.9: Número de Caules por m²

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	76±9	130±1	179±32
<i>M. sinensis</i>	146±0	276±1	219±41
<i>M. floridulus</i>	41±8	57±3	32±0

3.3.1.3. Índice de Área Foliar

A área foliar é uma das características ecológicas básicas e pode ser quantificado pelo Índice de área foliar (IAF). A área foliar de uma planta depende do número e do tamanho das folhas, sendo que sua variação dependerá da espécie e das condições edafoclimáticas (Monteiro *et al.*, 2005).

A área foliar por unidade de área de terreno (área do vaso neste caso) define o IAF, que é um elemento chave na caracterização da vegetação pelo papel das folhas verdes no metabolismo e regulação das plantas (Jonckheere *et al.*, 2004). Sendo assim, a fotossíntese que é o processo responsável pelo fornecimento da energia necessária ao crescimento e desenvolvimento da planta, depende do IAF.

A avaliação do desenvolvimento da área foliar do *Miscanthus*, assim como de outras espécies, pode ser usada para investigar sua adaptação a novas condições de crescimento, como as irrigações em estudo. O estudo deste parâmetro pode também permitir a identificação da capacidade produtiva (Gao *et al.*, 2013), do uso da água e de nutrientes, ou até do efeito do ataque de doenças.

IAF, é muito utilizado em modelos de simulação do crescimento e desenvolvimento vegetal, de interceptação de luz, de produção de biomassa, de consumo de água, de fixação de CO₂ e de comparação entre espécies (Asner *et al.*, 2003; Sinoquet *et al.*, 2007; Takeda *et al.*, 2008).

Quanto aos resultados obtidos, o maior IAF médio registado no presente trabalho foi calculado para o *M. x giganteus*, 4,94 cm²/cm² (ArNi). No caso deste genótipo, a irrigação com águas residuais contaminadas com os metais pesados em estudo, parece influenciar positivamente o IAF, sendo observado aproximadamente o dobro dos valores do Controlo (tabela 3.10). Nos restantes genótipos em estudo há também um maior IAF para os ensaios irrigados com ArCd e ArNi, mas não tão acentuado como no caso do híbrido. Os resultados obtidos através do tratamento estatístico não corroboram as afirmações anteriores, não se verificando diferenças estatísticas significativas entre os ensaios Controlo e os ensaios irrigados com as diferentes águas residuais contaminadas. A aplicação de águas residuais contaminadas com metais pesados, nas concentrações ensaiadas, não afectou, portanto, significativamente este parâmetro em termos estatísticos.

Sendo o IAF directamente influenciado pelas reservas de N existentes na planta na altura do corte (Avice *et al.*, 1997; Teixeira *et al.*, 2007; Thornton e Millard, 1997) os resultados analisados, principalmente para *M. x giganteus*, dão a entender que há capacidade de retenção e utilização do referido nutriente para as condições do 1º ano de vegetação e tudo indica que também para o 2º, embora sejam necessários estudos futuros.

Tabela 3.10: Índice de área foliar médio (cm²/cm²)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	2,24±0,35	4,37±0,63	4,94±0,01
<i>M. sinensis</i>	1,24±0,05	2,09±0,57	2,08±0,34
<i>M. floridulus</i>	0,54±0,07	1,15±0,45	0,98±0,41

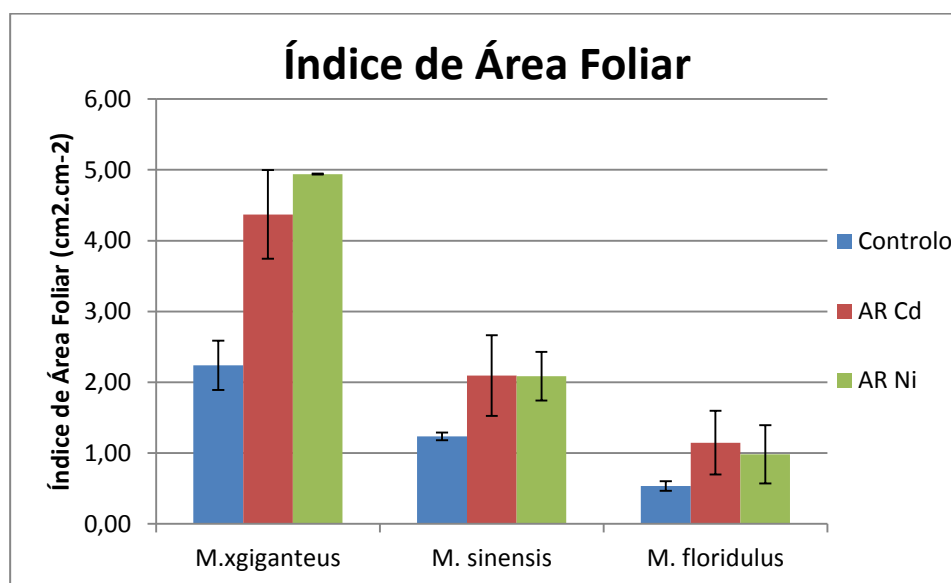


Figura 3.4: Índice de área foliar médio

3.3.2. Produtividade

A produtividade da biomassa de uma cultura é um parâmetro importante que nos permite avaliar a sua susceptibilidade de valorização económica, pois representa o desenvolvimento e crescimento da planta. Os rendimentos de *Miscanthus* variam consideravelmente dependendo das condições edafoclimáticas do local em questão, sendo que os rendimentos mais elevados são obtidos no sul da Europa, mais concretamente nas regiões envolventes do Mediterrâneo, onde a água não é um factor limitante (Sims *et al.*, 2006). Estudos na Europa defendem que esta é a cultura energética com maior potencial de produção energética (Sims *et al.*, 2006; Heaton *et al.*, 2008a).

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios para a produtividade de biomassa aérea (tabela 3.11), existem diferenças estatísticas entre espécies de *Miscanthus* (valor $p=3E-04$; ANOVA) e também entre contaminações (valor $p=0,0416$; ANOVA). Através da aplicação do teste t neste parâmetro, verificam-se resultados significativamente superiores para o *M. x giganteus*, do que os registados nas famílias de *M. sinensis* e de *M. floridulus* para as irrigações estudadas.

Tabela 3.11: Produtividade Total média de *Miscanthus* (g/m², matéria seca).

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	1309±72	1063±4	1349±163
<i>M. sinensis</i>	317±45	616±151	571±118
<i>M. floridulus</i>	440±21	682±37	1162±316

A avaliação dos resultados obtidos permite-nos defender o efeito positivo das águas residuais na produtividade da biomassa aérea nos dois genótipos com menor produtividade, irrigados com ArNi. O estudo desta contaminação em comparação com o ensaio Controlo, onde se regista um valor $p=0,0172$ (teste t), corrobora a afirmação anterior. Nas restantes combinações não se verificam diferenças estatísticas significativas.

Os resultados obtidos para este parâmetro entram em concordância com Wanat *et al.* (2013), que tem como principal conclusão do seu estudo que, o *M. x giganteus* pode ser produzido com sucesso em ambientes de contaminação com metais pesados. Wanat e a sua equipa também defendem, que *M. x giganteus* sujeito a este tipo de contaminação, produz menor quantidade de biomassa. No presente trabalho, como visto anteriormente, os resultados não são esclarecedores pois o valor mais elevado, de 1349 g/m², é detectado na família do híbrido ao ser irrigado com a ArNi, embora sem significado estatístico.

O segundo ano de estabelecimento dos três genótipos, no projecto em questão, registou valores de produtividade média total muito superiores aos registados no primeiro ano (por comparação com os dados dos vasos controlo de Bandarra, 2013). Nos ensaios controlo, sujeitos ao mesmo tipo de irrigação nos dois anos, verificou-se mais do dobro da produtividade média para a família de *M. x giganteus*, o *M. sinensis* viu a sua produtividade aumentada em pouco mais de quatro vezes e o *M. floridulus* registou um menor aumento no caso dos ensaios controlo, mas muito significativo para as contaminações com metais pesados. Os resultados apresentados estão de acordo com o defendido por Zub *et al.* (2011), que através do seu estudo verifica uma maior produtividade para os genótipos triplóides (*M. x giganteus* e *M. floridulus*) e tetraplóides do que para os diplóides (*M. sinensis*).

A disparidade entre as produtividades médias dos genótipos *M. x giganteus* e *M. sinensis* havia sido notada em anteriores trabalhos testados em zonas como o Reino Unido, Alemanha e Portugal, sendo que os autores defendem uma notória superioridade por parte do *M. x giganteus*, no que toca à produtividade (Clifton-Brown *et al.*, 2001; Clifton-Brown e Lewandowski, 2002).

De modo a obter um estudo mais detalhado da produtividade de *Miscanthus*, procedeu-se à avaliação da produtividade média dos diferentes componentes da biomassa

aérea da cultura em questão. São analisadas as produtividades médias de: folhas, caules e biomassa não *Miscanthus*.

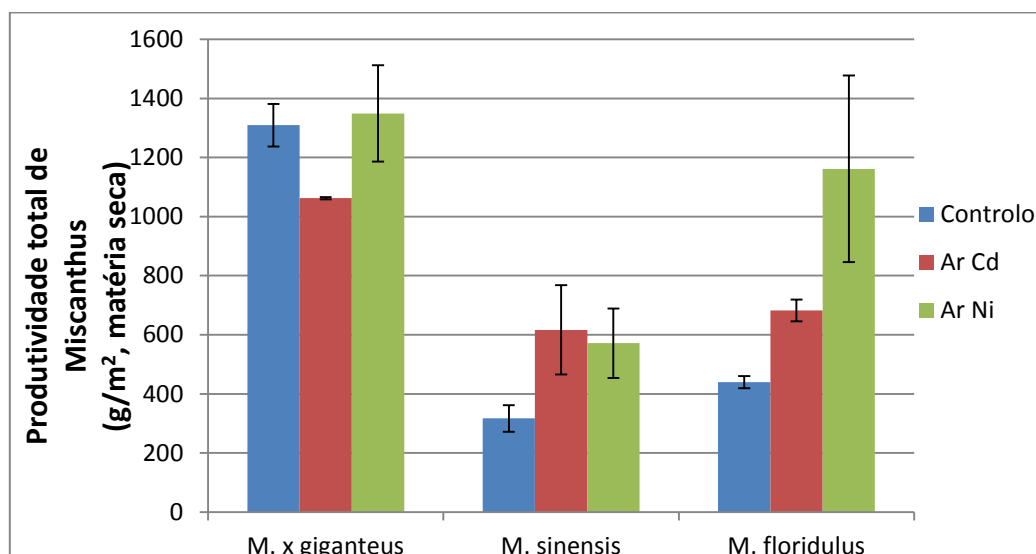


Figura 3.5: Produtividade total média de *Miscanthus* (g/m², matéria seca).

Na tabela 3.12 estão apresentados os resultados da produtividade média de folhas para os diferentes tipos de irrigação. O tratamento estatístico revela diferenças entre espécies, tal como entre contaminações. Ao realizar o teste t, é comprovada a influência positiva das contaminações com metais pesados na produtividade média de folhas, nos genótipos *M. x giganteus* e *M. sinensis*. Estes genótipos não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao seu comportamento tendo em conta a aplicação das três diferentes contaminações (valor $p=0,2459$; teste t). Para o *M. floridulus*, embora pareça existir também um efeito positivo por parte das águas residuais, esta premissa não foi comprovada pela análise estatística ao serem obtidos “valores p” superiores a 0,05 para ambas as águas residuais estudadas.

Tabela 3.12: Produtividade média de folhas para os diferentes tipos de irrigação (g/m², matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	302±46	614±53	654±6
<i>M. sinensis</i>	212±26	506±158	480±46
<i>M. floridulus</i>	56±10	103±9	140±48

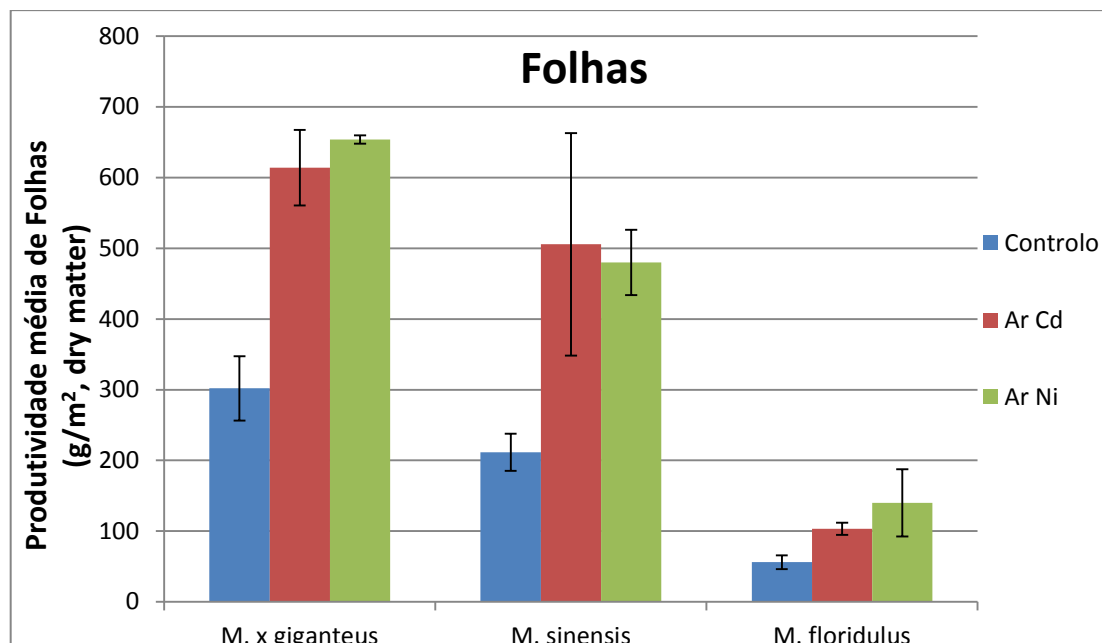


Figura 3.6: Produtividade média de folhas para os diferentes tipos de irrigação (g/m², matéria seca)

No que diz respeito aos resultados obtidos para a produtividade dos caules de *Miscanthus* sujeitos às três diferentes irrigações descritas ao longo do trabalho (tabela 3.13), são resultados interessantes quando comparados com o parâmetro nº de caules por m², analisado em cima. Ao comparar os resultados expostos nas tabelas 3.9 e 3.13, percebe-se que as famílias com mais elevada produtividade média de caules são aquelas que representam menor número de caules por m².

Tabela 3.13: Produtividade média de caules para os diferentes tipos de irrigação (g/m², matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	616±21	395±42	656±147
<i>M. sinensis</i>	63±21	90±4	73±53
<i>M. floridulus</i>	232±63	518±33	1022±269

Da análise dos resultados estatísticos obtidos, conclui-se que no caso dos caules não são esclarecedores como são para a produtividade média das folhas. Primeiramente a aplicação do modelo ANOVA, demonstra diferenças significativas entre espécies e entre contaminações. Complementando com a aplicação do teste t não se verificam diferenças entre Controlo e ArCd/ArNi, para nenhum dos genótipos. Ainda assim, importa realçar os resultados obtidos para a família do *M. floridulus*, que como pode ser observado pela figura xxx, denota um grande aumento da produtividade média dos caules para ambas as irrigações com águas residuais contaminadas com Cd (518 g/m²) e Ni (1022 g/m²).

Os caules são a fracção que representa o maior contributo para a produtividade global (48,68% do total).

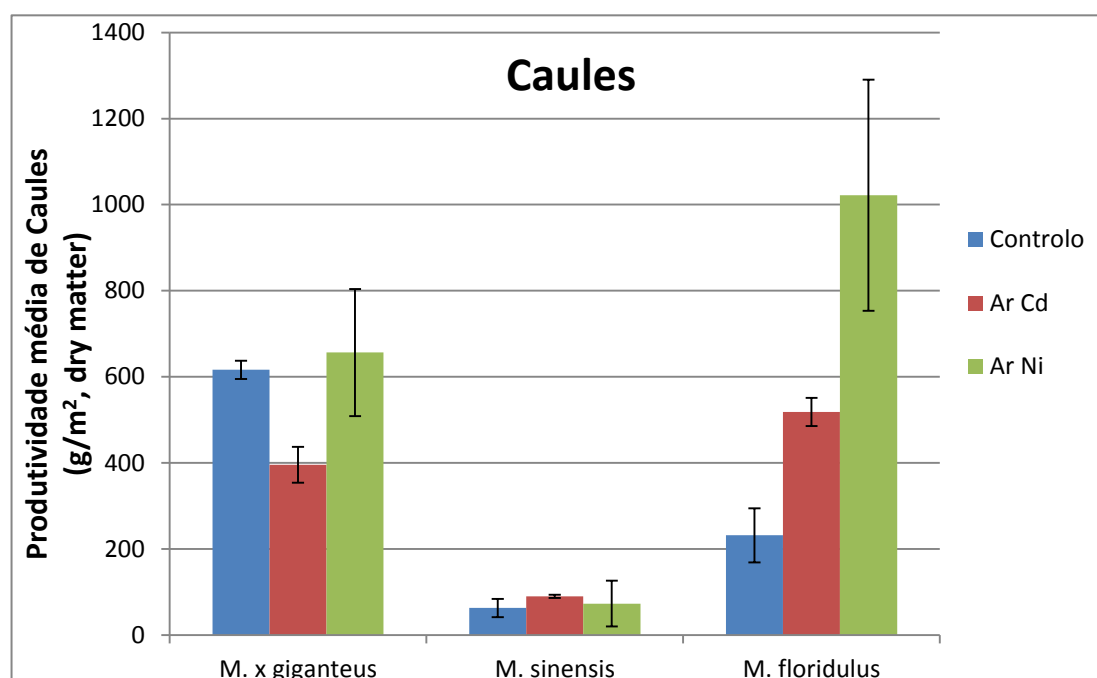


Figura 3.7: Produtividade média de caules para os diferentes tipos de irrigação (g/m^2 , matéria seca)

A tabela 3.14 indica a produtividade média de biomassa não *Miscanthus* (ervas daninhas). O tratamento estatístico aplicado aos genótipos onde existiu biomassa não *Miscanthus* (*M. sinensis* e *M. floridulus*), não revelou diferenças estatísticas significativas quer entre espécies, quer entre contaminações.

Tabela 3.14: Produtividade média de biomassa não *Miscanthus*, panícula e manta morta, para os diferentes tipos de irrigação (g/m^2 , matéria seca)

		Controlo	Ar Cd	Ar Ni
Bio. não Misc.	<i>M. x giganteus</i>	-	-	-
	<i>M. sinensis</i>	110±32	89±6	178±123
	<i>M. floridulus</i>	20±19	60±23	74±65
Panícula	<i>M. x giganteus</i>	48±11	22±16	39±9
	<i>M. sinensis</i>	2±2	21±10	18±10
	<i>M. floridulus</i>	-	-	-
Manta Morta	<i>M. x giganteus</i>	343±30	31±20	-
	<i>M. sinensis</i>	40±7	-	-
	<i>M. floridulus</i>	152±45	61±61	-

3.3.3. Caracterização Química da Biomassa

3.3.3.1. Teor de Cinzas

A figura 3.8 exibe o teor de cinzas nos caules, folhas, biomassa não *Miscanthus*, manta morta e panículas da biomassa aérea de *Miscanthus*. O *M. floridulus* não apresentou panículas. O bom conhecimento do teor de cinzas da biomassa é vital para a sua valorização energética e é também muito importante de uma perspectiva ambiental. Os minerais que resultam da combustão das cinzas durante a combustão, podem causar sérios problemas pela deposição nos equipamentos. O mecanismo de deposição tem sido objecto de estudo ao longo da década de 1990 (Miles, 1996; Baxter, 1993; Bryers, 1996).

Durante a combustão da biomassa, alguma matéria mineral pode originar óxidos, hidróxidos, compostos clorados ou sulfatados, que tendem a ser libertados como vapor, sendo significativamente prejudiciais ao meio ambiente (Baxter *et al.*, 2011). Posto isto, este é um importante parâmetro para a avaliação da qualidade da biomassa em estudo.

Quanto aos resultados do presente estudo, verifica-se um maior teor de cinzas nas folhas que nos caules (figura 3.8 e 3.9). O genótipo que apresenta menor teor de cinzas (% matéria seca) é o *M. x giganteus*, tanto para as folhas como para os caules, mas não nas panículas. Não foram detectadas diferenças estatísticas significativas entre os diferentes tipos de contaminação, para todas as fracções de biomassa.

Tabela 3.15: Teor de cinzas dos caules (% matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	1,90±0,34	2,62±0,12	3,01±0,11
<i>M. sinensis</i>	4,36±0,26	4,82±0,14	5,57±1,05
<i>M. floridulus</i>	4,34±0,57	5,45±0,10	4,91±0,54

Os caules provenientes dos vasos irrigados com as águas residuais apresentam maior teor de cinzas que os vasos Controlo (Tabela 3.15). O resultado mais elevado foi detectado para os ensaios de *M. sinensis* irrigados com ArNi (5,57 %, matéria seca) e o mais baixo, para os ensaios de *M. x giganteus* irrigados com água da rede (1,90 %, matéria seca).

O tratamento estatístico, no que diz respeito à influência das águas residuais na variação do teor de cinzas nos caules, revelou a inexistência de interações estatisticamente relevantes.

O resultado obtido para o *M. x giganteus* foi, contudo, esclarecedor. Este genótipo apresentou resultados inferiores aos restantes, o que pode ser verificado pelos valores p calculados pela aplicação:

- Valor p = 4E-4; quando estudada a sua relação com a amostra *M. sinensis*;
- Valor p = 8E-05; quando estudada a sua relação com a amostra *M. floridulus*.

Importa referir o resultado obtido para a influência da ArCd nos genótipos *M. sinensis* e *M. floridulus*, em relação aos seus controlos. O resultado obtido (Valor $p=0,051$; teste t) encontra-se muito próximo de 0,05, estabelecido está que resultados inferiores a este valor são estatisticamente significativos.

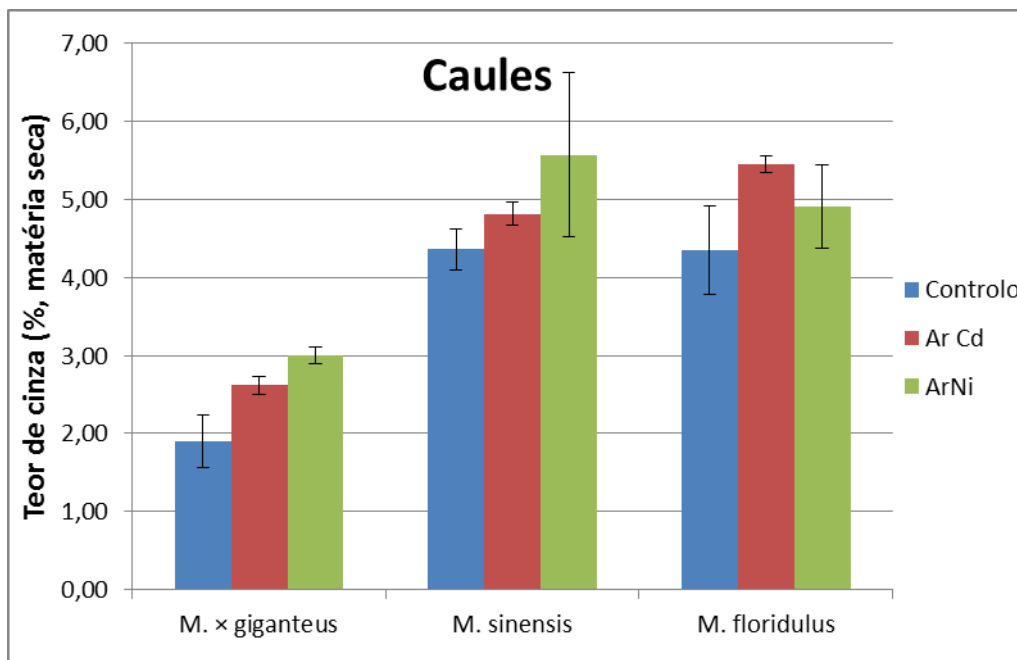


Figura 3.8: Teor médio de cinzas dos caules (% de matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação

As folhas apresentam, para cada família de *Miscanthus*, valores similares do teor de cinzas, independentemente do tipo de irrigação e tal como se sucede nos caules, também para as folhas não foram detectadas diferenças estatísticas significativas quer entre contaminações, quer entre espécies. Para o *M. x giganteus* os resultados são também idênticos aos registados nos caules:

- Valor $p=0,0011$; quando estudada a sua relação com a amostra *M. sinensis*;
- Valor $p=7,6E-06$; quando estudada a sua relação com a amostra *M. floridulus*.

O maior teor de cinzas é registado na família do *M. sinensis* nos vasos Controlo. Por sua vez, o *M. x giganteus* regista o menor resultado respeitante ao teor de cinzas – 4,69% (ArCd). Os resultados referidos encontram-se apresentados na tabela 3.16, em baixo.

Os resultados obtidos para o *M. x giganteus* são bastante semelhantes aos resultados obtidos pela equipa liderada por Baxter (2011) – 2% de teor de cinzas para os caules e 6% para as folhas.

Tabela 3.16: Teor de cinzas das folhas (% matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	6,49±0,17	4,69*	5,86±0,08
<i>M. sinensis</i>	10,7±0,2	7,73±0,05	8,37±0,06
<i>M. floridulus</i>	9,55±0,48	10,1±1,2	9,63±0,32

*(por falta de amostra apenas foi realizada uma determinação)

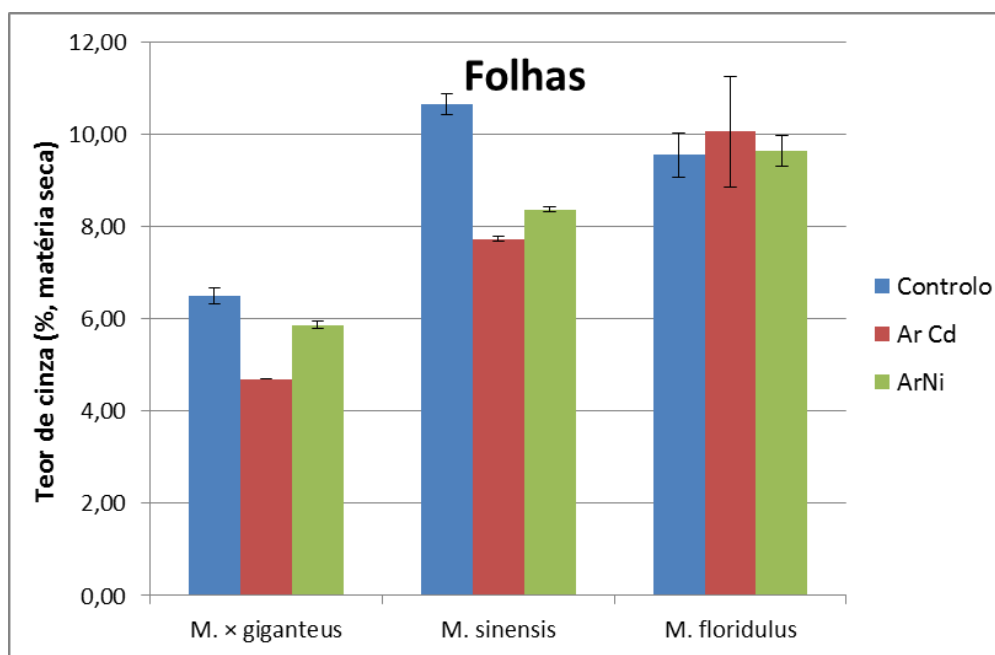


Figura 3.9: Teor médio de cinzas das folhas (% de matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação.

De seguida são apresentados os resultados do teor de cinzas da panícula. Este é um componente da planta objecto de estudo, pois pode permitir perceber a sensibilidade do genótipo em questão às condições a que foi sujeito. Este conhecimento pode ser importante sobretudo entre clones, por exemplo, para melhorar condições de cultivo e produção da cultura energética (Arnoult *et al.*, 2014).

No que aos resultados diz respeito (tabela 3.17), o teor de cinzas observado nas panículas parece ter tendência a ser mais elevado para o *M. x giganteus* e mais reduzido para o *M. sinensis*, quando sujeitos a irrigação com as águas residuais contaminadas. Contudo, o tratamento estatístico dos resultados não indica diferenças estatisticamente significativas que comprovem a afirmação anterior.

Tabela 3.17: Teor de cinzas da panícula (% matéria seca).

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	4,58±0,32	6,29±1,05	6,52±0,24
<i>M. sinensis</i>	6,40*	4,56±0,28	4,78*
<i>M. floridulus</i>	-	-	-

*(por falta de amostra apenas foi realizada uma determinação)

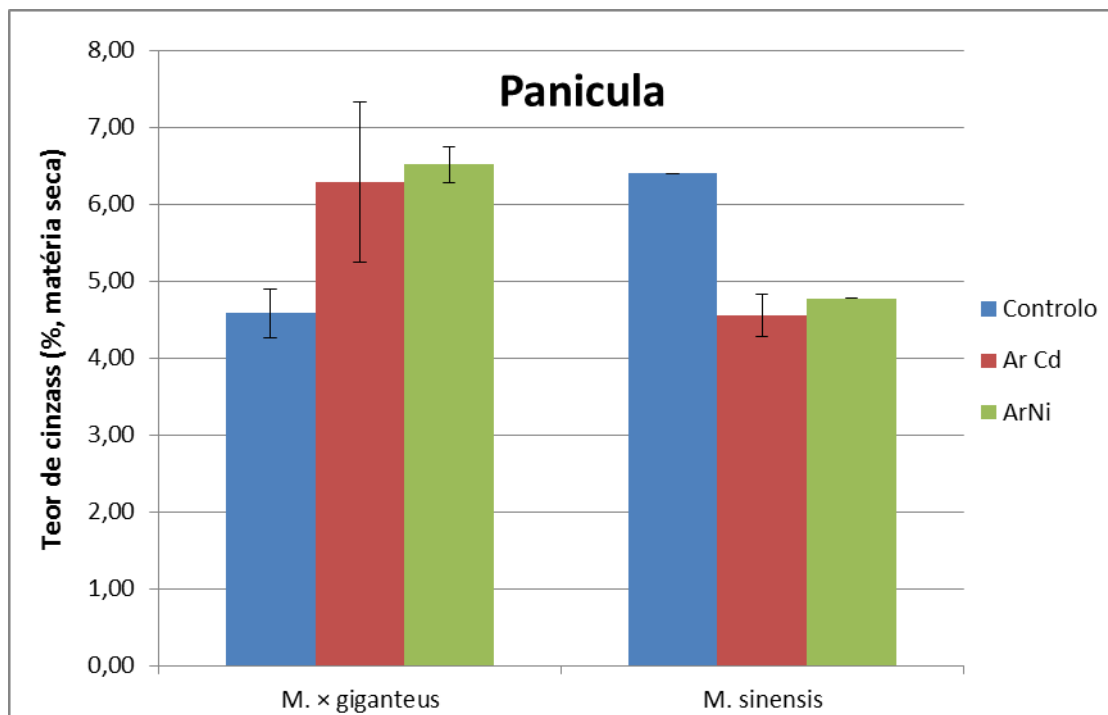


Figura 3.10: Teor médio de cinzas da panícula (% de matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação.

Os vasos Controlo e os vasos ArCd (com exceção para o *M. sinensis*) apresentaram matéria morta, sendo a sua percentagem de cinza calculada e apresentada na tabela 3.18. Não se verificam diferenças estatisticamente significativas entre os vasos com os diferentes génotipos em estudo e entre a contaminação com ArCd. O resultado mais elevado foi 17,02% (*M. sinensis*, Controlo) e o mais baixo 7,34% (*M. x giganteus*, Controlo). De referir, os resultados mais elevados observados nos vasos ArCd em relação aos vasos controlo, embora sem significado estatístico.

Tabela 3.18: Teor de cinzas da manta morta (% matéria seca).

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	7,34±1,79	10,7*	-
<i>M. sinensis</i>	17,0*	-	-
<i>M. floridulus</i>	11,6±0,23	15,0*	-

*(por falta de amostra apenas foi realizada uma determinação)

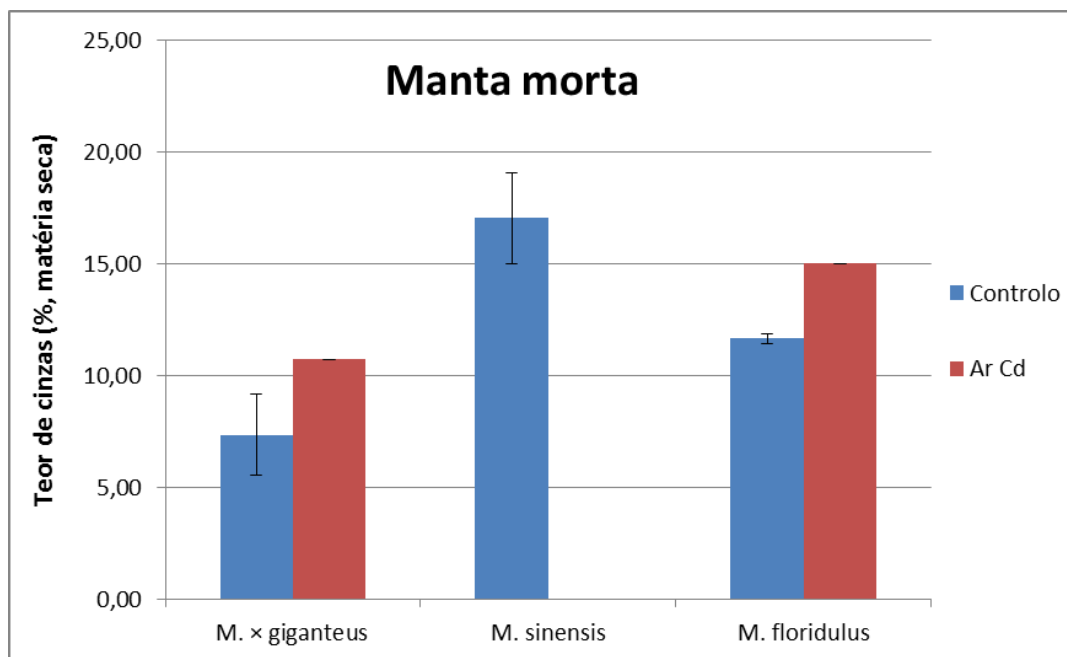


Figura 3.11: Teor médio de cinzas da Manta Morta (% de matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação.

Não se desenvolveu biomassa não *Miscanthus* significativa nos vasos da família do genótipo *M. x giganteus*. O *M. sinensis*, à semelhança do verificado para a panícula, apresentou percentagem de cinzas mais reduzida nos ensaios irrigados com ArCd e ArNi. O *M. floridulus* apresentou precisamente o contrário, com resultados superiores para os vasos contaminados com metais pesados.

Tabela 3.19: Teor de cinzas da biomassa não *Miscanthus* (% matéria seca).

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	-	-	-
<i>M. sinensis</i>	9,09±1,66	5,83±0,37	3,86*
<i>M. floridulus</i>	8,22*	17,0*	12,0*

*(por falta de amostra apenas foi realizada uma determinação)

Globalmente, podemos afirmar que as folhas são a fracção que mais acumula cinzas, seguindo-se a espiguetta e por fim os caules, mas ambos com valores muito semelhantes. Se se considerar a manta morta e a biomassa não *Miscanthus* verifica-se que a concentração em cinzas nestas fracções é muito elevada, muito superior à observada nas folhas verdes do *Miscanthus*.

3.3.3.2. Teor de Azoto

Diversos genótipos pertencentes à família do *Miscanthus*, são de elevado interesse energético por uma variedade de razões, onde se incluem as elevadas eficiências no uso de Azoto (Christian *et al.*, 1997; El Bassam, 2010). A quantidade de azoto captado e distribuído pela planta pelos seus diversos órgãos, influencia a capacidade de intercepção da luz e a capacidade fotossintética da cultura, por consequência. Ambas são beneficiadas se o N for alocado na biomassa aérea (Gastal e Lemaire, 2002). Em diversas culturas, deficiência de N leva à alteração da captura de radiação através da redução do índice de área foliar e/ou ao decréscimo da conversão de recursos (Belanger *et al.*, 1992; Colnenne *et al.*, 2002; Muchow e Davis, 1988).

Todos os exemplos descritos no parágrafo anterior são factores pelos quais se torna importante a análise do teor de azoto, mas também pela influência que este pode ter na utilização da biomassa para a produção de energia. Mais concretamente no caso da combustão, a libertação de gases NO_x (GEEs), em que quanto maior o teor de azoto presente na biomassa, maior será a libertação destes gases nocivos ao meio ambiente (Biewinga e Van der Bijl, 1996).

Os resultados calculados para o teor médio de azoto nos caules de *Miscanthus* para os diferentes tipos de irrigação encontram-se na tabela 3.20. O tratamento estatístico dos mesmos revela inexistência de diferenças estatísticas relevantes entre contaminações (valor $p=0,37$; ANOVA). Pelo contrário, diferenças estatísticas significativas, são observadas entre as espécies de *Miscanthus* em estudo (valor $p=0,0012$; ANOVA).

Entre espécies, é detectado um comportamento similar dos genótipos *M. x giganteus* e *M. floridulus* às condições de contaminação a que foram sujeitos, sendo comprovada pelo tratamento estatístico a influência positiva da Ar Cd no teor de azoto em relação ao controlo. No caso do *M. sinensis* não são detectadas diferenças significativas entre as contaminações estudadas.

Tabela 3.20: Teor de azoto nos caules (% N, matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	0,069±0,002	0,134±0,004	0,115±0,012
<i>M. sinensis</i>	0,350±0,096	0,481±0,048	0,449±0,204
<i>M. floridulus</i>	0,087±0,017	0,179±0,038	0,108±0,029

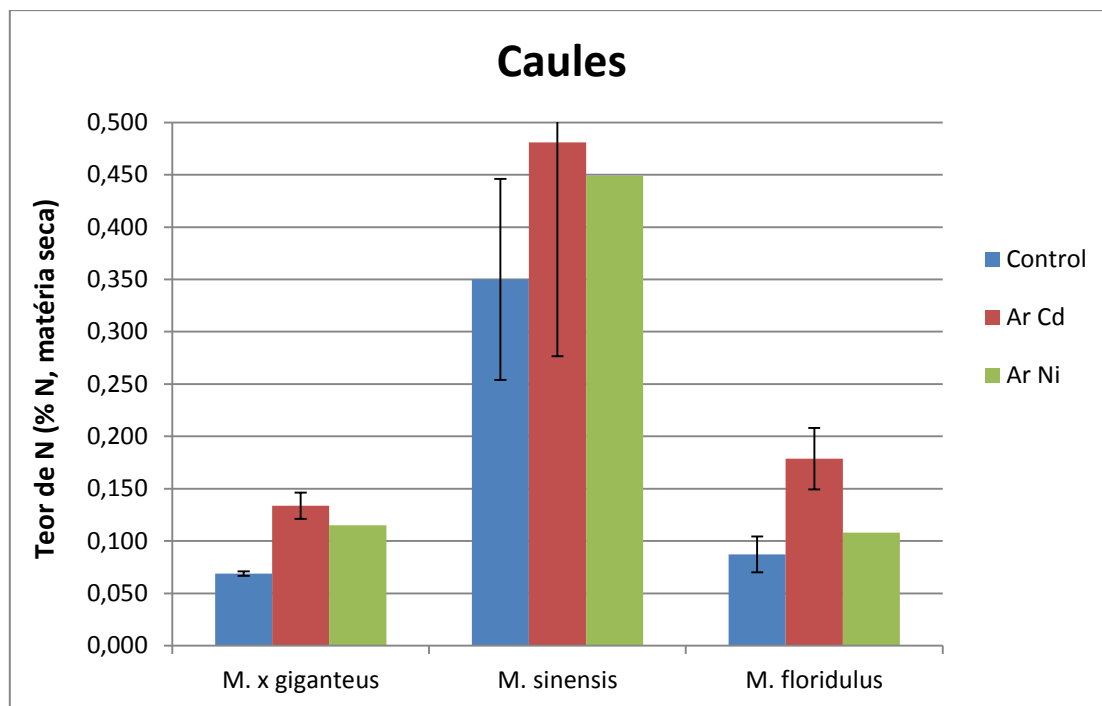


Figura 3.12: Teor médio de azoto de caules de *Miscanthus* (% N, matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação

No que diz respeito ao tratamento estatístico aplicado ao teor de azoto nas folhas, os resultados são opostos aos observados nos caules. Neste caso as diferenças estatisticamente significativas verificam-se entre contaminações (valor $p=0,003$; ANOVA) e não entre espécies de *Miscanthus* (valor $p=0,314$; ANOVA). As diferenças estatísticas verificam-se pela análise da figura 3.17, onde a influência das águas residuais contaminadas com metais pesados é notória (verifica-se um aumento do N na biomassa regada com AR). Os “valores p” calculados através da aplicação do “teste t” são $9E-06$ e $0,0066$, para a ArCd e para a ArNi respectivamente. Isto poderá estar relacionado com as formas de azoto presentes nas águas residuais, podendo permitir a sua acumulação nas folhas pois este é o componente com mais susceptibilidade de acumulação de nutrientes.

Tabela 3.21: Teor de azoto nas folhas (% N, matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	0,181±0,033	0,595±0,113	0,479±0,047
<i>M. sinensis</i>	0,259±0,066	0,596±0,046	0,717±0,300
<i>M. floridulus</i>	0,266±0,014	0,634±0,018	0,809±0,101

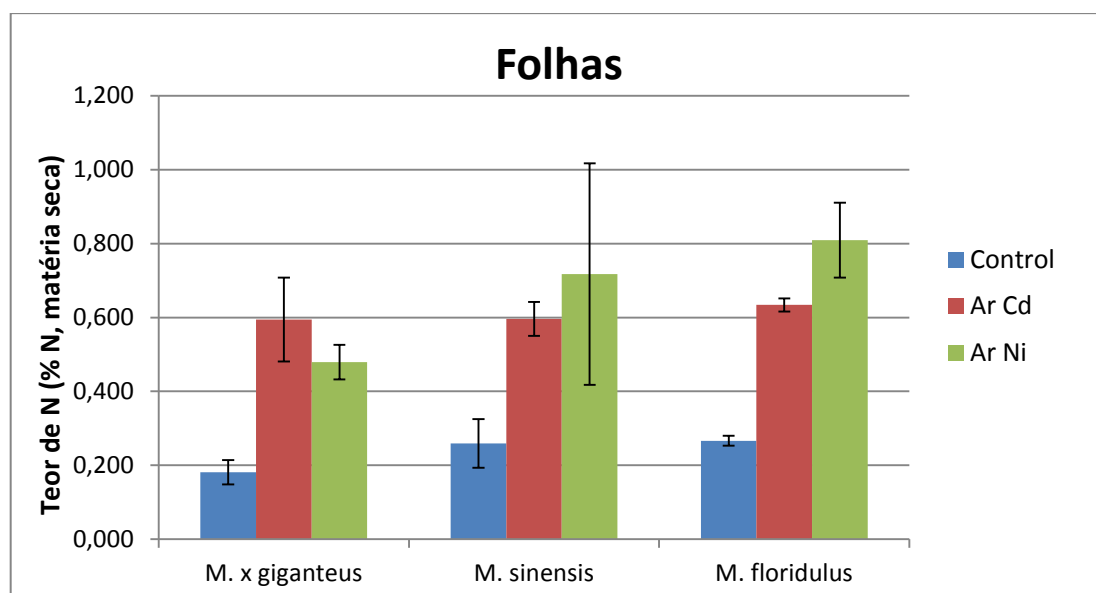


Figura 3.13: Teor médio de azoto de folhas de *Miscanthus* (% N, matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação

A tabela 3.22 apresenta os resultados obtidos no ensaio referente ao teor de azoto na panícula. As plantas do genótipo *M. floridulus* não desenvolveram espiguetas, como tal, esse genótipo não irá ser discutido. O teor de azoto detectado na panícula é mais elevado para a família de *M. x giganteus* do que para a de *M. sinensis* (valor $p=0,028$; teste t). Entre contaminações, não são detectadas diferenças significativas estatisticamente – valor $p=0,1006$; ANOVA.

Tabela 3.22: Teor de azoto na panícula (% N, matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	0,591±0,009	0,761±0,097	0,680±0,084
<i>M. sinensis</i>	*	0,594±0,318	0,129*
<i>M. floridulus</i>	-	-	-

*(não houve amostra suficiente para análise ou para repetir análises)

O teor de azoto presente na biomassa pode ser afectado pela interacção entre o azoto utilizado na fertilização e na irrigação (as águas residuais são ricas em azoto), isto é, quando a planta é irrigada e fertilizada com azoto, o teor de azoto na biomassa pode aumentar (Ercoli *et al.*, 1999), o que pode justificar os elevados valores de teor de azoto em alguns ensaios. Por outro lado, a existência de ensaios com menor teor de azoto calculado, pode ser explicado pela translocação dos nutrientes da fracção aérea para o rizoma, no fim do ciclo vegetativo.

O teor de azoto calculado para a manta morta e para a biomassa não *Miscanthus* para os diferentes tipos de irrigação, é apresentado nas tabelas 3.23 e 3.24, respectivamente. De notar a inexistência de manta morta para todas as espécies quando irrigadas com água

residual contaminada com Ni (ArNi). Para o *M. x giganteus*, não foi detectada biomassa não *Miscanthus* suficiente para proceder à análise do teor de azoto.

Tabela 3.23: Teor de azoto na manta morta (% N, matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	0,519±0,031	0,719*	-
<i>M. sinensis</i>	0,748±0,082	-	-
<i>M. floridulus</i>	0,451±0,071	0,618*	-

*(por falta de amostra apenas foi realizada uma determinação)

Tabela 3.24: Teor de azoto na biomassa não *Miscanthus* (% N, matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	-	-	-
<i>M. sinensis</i>	0,524±0,149	0,482±0,049	0,647*
<i>M. floridulus</i>	0,367*	0,615*	1,263*

*(por falta de amostra apenas foi realizada uma determinação)

3.3.3.3. Teor de Fósforo

A análise do teor de fósforo presente na biomassa é muito importante pois este é um elemento crucial no metabolismo das plantas, desempenhando um papel importante na transferência de energia da célula, na respiração e na fotossíntese (Boatwright e Viets, 1966). Para além de componente estrutural de muitos elementos fundamentais ao bom desenvolvimento da planta, o fósforo pode também ser um problema quando presente em elevadas quantidades. A toxicidade de fósforo tem efeitos nefastos nas plantas, sobretudo em situações em que a sua concentração está acima de 10 a 20 g P/kg de matéria seca. A concentração adequada de fósforo na parte aérea das plantas é de 2 a 5 g P/kg de matéria seca (Varennnes, 2003).

A tabela 3.25 apresenta os resultados obtidos para o teor de fósforo presente nos caules das várias espécies de *Miscanthus*, sujeitas a diferentes tipos de irrigação. A análise da figura 3.14 torna claro o decréscimo do teor de fósforo nos ensaios irrigados com águas residuais contaminadas com metais pesados, em relação aos ensaios Controlo. A frase anterior é comprovada através do tratamento estatístico aplicado. Há diferenças estatisticamente significativas entre contaminações, ou seja, a irrigação com águas residuais contaminadas com os metais pesados em questão parece influenciar negativamente o teor de fosforo nos caules dos três genótipos de *Miscanthus* (valor $p=0,029$; ANOVA). Há também diferenças estatisticamente significativas entre os três genótipos em estudo, para o teor de fósforo presente nos caules (valor $p=5,37E-05$; ANOVA).

O *M. sinensis* foi o genótipo com teores de fósforo mais elevados, em todos os tipos de contaminação. O valor mais elevado foi registado para o ensaio ArCd deste genótipo ($0,118 \pm 0,015$ % N, matéria seca) e o mais baixo para o Controlo do *M. x giganteus* ($0,016 \pm 0,002$ % N, matéria seca).

Tabela 3.25: Teor de fósforo nos caules (% P, matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	$0,016 \pm 0,002$	$0,032 \pm 0,005$	$0,034 \pm 0,017$
<i>M. sinensis</i>	0,054*	$0,118 \pm 0,015$	$0,098 \pm 0,021$
<i>M. floridulus</i>	$0,018 \pm 0,005$	$0,025 \pm 0,011$	$0,018 \pm 0,003$

*(por falta de amostra apenas foi realizada uma determinação)

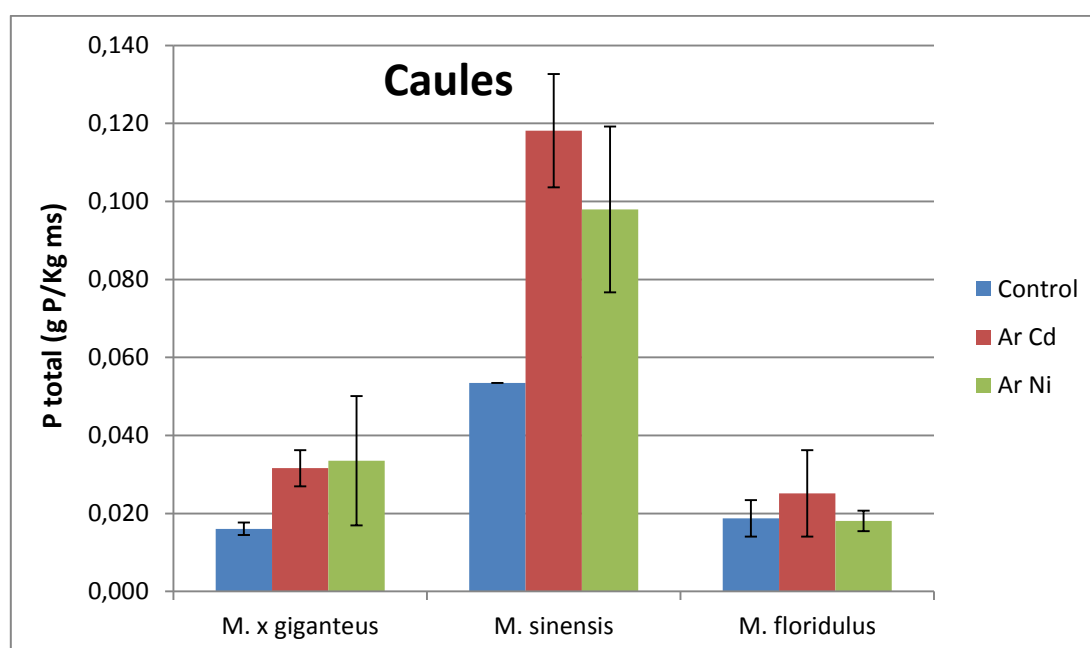


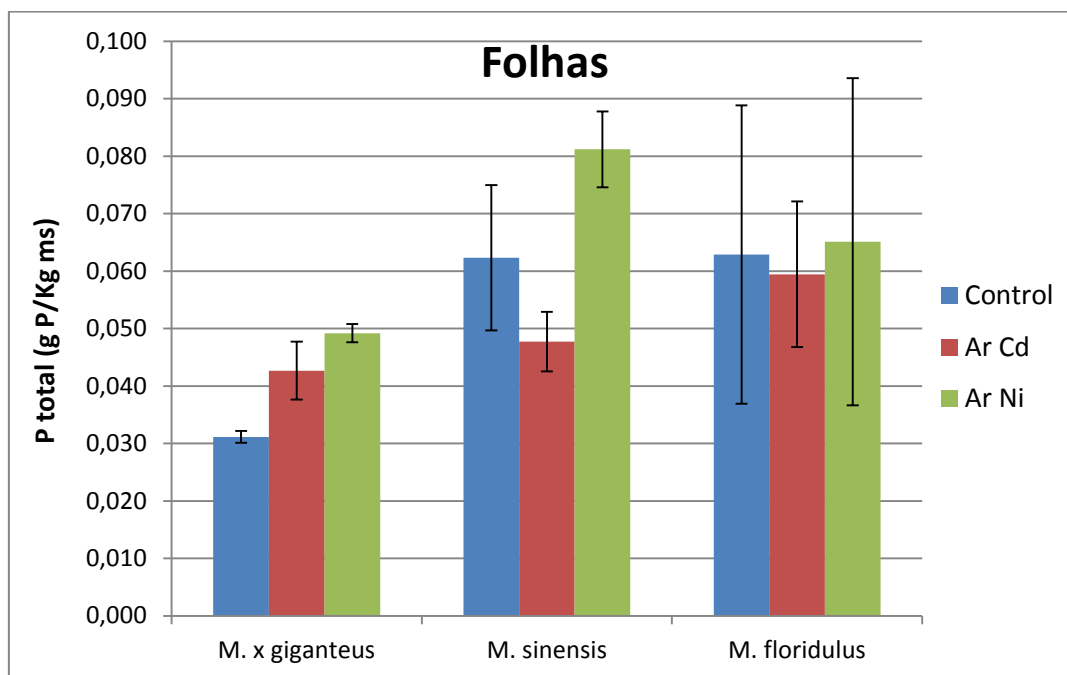
Figura 3.14: Teor médio de fósforo de caules de Miscanthus (% N, matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação

Os resultados obtidos para o segundo componente da planta analisado neste parâmetro, as folhas, são similares aos discutidos para o teor de fósforo nos caules, excepto para o genótipo *M. sinensis* onde os ensaios irrigados com águas residuais registam valores inferiores (figura 3.15).

Estatisticamente, não são registadas diferenças entre contaminações. O teor de fósforo não parece ser influenciado, pela utilização das águas residuais contaminadas com Cd e Ni na irrigação. O valor mais elevado para o teor de fósforo nas folhas, observa-se para o ensaio ArNi do *M. sinensis* ($0,081 \pm 0,007$ % N, matéria seca) e o mais baixo para o Controlo do *M. x giganteus* ($0,031 \pm 0,001$ % N, matéria seca).

Tabela 3.26: Teor de fósforo nas folhas (% P, matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	0,031±0,001	0,043±0,005	0,049±0,002
<i>M. sinensis</i>	0,062±0,013	0,048±0,005	0,081±0,007
<i>M. floridulus</i>	0,063±0,026	0,059±0,013	0,065±0,028

Figura 3.15: Teor médio de fósforo de folhas de *Miscanthus* (% N, matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação

Na tabela 3.27 são apresentados os resultados calculados do teor de fósforo na panícula dos genótipos *M. x giganteus* e *M. sinensis*, o genótipo *M. floridulus* não desenvolveu este componente vegetal. O valor mais elevado é obtido na família de *M. x giganteus* quando irrigado apenas com água da rede (0,944 % N, matéria seca) e o valor calculado mais reduzido para *M. sinensis* irrigado com ArNi (0,097 % N, matéria seca). Observam-se diferenças significativas quer entre contaminações (valor $p=0,0155$; ANOVA), quer entre genótipos (valor $p=0,0003$; ANOVA). O valor p obtido através do teste t (0,0096) aplicado à combinação Controlo/ArCd, revela influência das águas residuais contaminadas com Cd no teor de fósforo, nas folhas de *Miscanthus*.

Tabela 3.27: Teor de fósforo na panícula (% P, matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	0,094±0,011	0,183±0,006	0,160±0,004
<i>M. sinensis</i>	*	0,181±0,020	0,097*
<i>M. floridulus</i>	-	-	-

*(não houve amostra suficiente para análise ou para repetir análises)

O teor de fósforo calculado para a manta morta e para a biomassa não *Miscanthus* para os diferentes tipos de irrigação, é apresentado nas tabelas 3.28 e 3.29, respectivamente. De notar a inexistência de manta morta para todas as espécies quando irrigadas com água residual contaminada com Ni (ArNi). Para o *M. x giganteus*, não foi detectada biomassa não *Miscanthus* suficiente para proceder à análise do teor de azoto.

Tabela 3.28: Teor de fósforo na manta morta (% P, matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	0,058±0,004	0,118*	-
<i>M. sinensis</i>	0,105±0,002	-	-
<i>M. floridulus</i>	0,054±0,004	0,092*	-

*(por falta de amostra apenas foi realizada uma determinação)

Tabela 3.29: Teor de fósforo na biomassa não *Miscanthus* (% P, matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	-	-	-
<i>M. sinensis</i>	0,106±0,085	0,063±0,001	0,052*
<i>M. floridulus</i>	0,106*	0,100*	0,179*

*(por falta de amostra apenas foi realizada uma determinação)

3.3.3.4. Metais

3.3.3.4.1. Cádmio

O Cádmio é um contaminante de alta importância por exemplo, nos Estados Unidos da América é considerado como o segundo metal com maior importância enquanto poluente ambiental (Salt *et al.*, 1998). Este metal pesado é um elemento tóxico não essencial que pode ter efeitos nefastos para plantas, animais e humanos, mesmo em doses muito reduzidas (Kirkham, 2006). Sendo assim, a remediação da poluição de Cd no ambiente torna-se muito importante e urgente de modo a prevenir ameaças, como é o caso das águas residuais contaminadas com este metal.

De seguida será analisado o teor de Cd presente nos três genótipos de *Miscanthus* estudados. São apresentados os resultados para as diferentes fracções da planta: caules, folhas, panícula, biomassa não *Miscanthus* e manta morta.

Os resultados apresentados na tabela 3.30 indicam que as plantas irrigadas com águas residuais contaminadas com Cd, parecem acumular um maior teor do metal do que a biomassa referente ao ensaio controlo. Em termos estatísticos, não foram verificadas diferenças significativas na acumulação deste metal pesado, tanto entre contaminações como entre as espécies estudadas.

A inexistência de diferenças entre contaminações pode dever-se ao valor registado para a família de *M. x giganteus* sujeita à irrigação com água da rede (Controlo) e com água residual contaminada com Ni. Estes são valores de todo inesperados, justificados por uma possível contaminação, daí o ser elevado e incoerente pois a água de rede não contém concentrações de Cd suficientes para a ocorrência da acumulação obtida. A mesma justificação aplica-se ao elevado valor registado para os caules de *M. sinensis* aquando da irrigação com ArNi. Os resultados obtidos para o Controlo de *M. sinensis* e *M. floridulus*, em termos de teor de Cd, são o esperado uma vez que nesta rega se estava a administrar Cd em solução.

O teor de Cd registado nos ensaios irrigados com a ArCd foi superior para o *M. x giganteus*, sendo este o genótipo com maior capacidade para fitoextrair o Cd da solução do solo.

Tabela 3.30: Teor de Cádmio nos caules (mg (Cd)/ kg matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	0,389±0,303	0,322±0,300	0,128±0,108
<i>M. sinensis</i>	nd	0,108±0,098	0,174±0,114
<i>M. floridulus</i>	nd	0,288±0,001	nd

(Nd) não detectável

Nas folhas, são calculados valores de teor de Cd semelhantes aos registados nos caules dos ensaios irrigados com ArCd. Tal como no caso dos caules, o *M. x giganteus* é o genótipo com maior capacidade para fitoextrair este metal pesado, apresentando o teor mais elevado (0,244 mg Cd/kg matéria seca) mas este valor não é comprovado pelo tratamento estatístico, que não detecta diferenças significativas entre espécies (valor p=0,3914; ANOVA).

Entre contaminações, são detectadas diferenças significativas e através da aplicação do teste t, obtém-se um valor p de 0,0079 para a interacção entre os ensaios controlo e os ensaios ArCd, tal como esperado.

Tabela 3.31: Teor de Cádmio nas folhas (mg (Cd)/ kg matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	nd	0,244±0,076	nd
<i>M. sinensis</i>	nd	0,235±0,015	0,159±0,040
<i>M. floridulus</i>	0,115±0,098	0,115±0,005	0,020±0,018

(Nd) não detectável

Não se verificam diferenças estatísticas significativas no teor de Cd presente na panícula (tabela 3.32) entre as espécies que desenvolveram panícula – *M. x giganteus* e *M. sinensis* (valor p = 0,8775; ANOVA). Entre contaminações são registadas diferenças significativas (valor p = 0,0022; ANOVA) e especificando o estudo do teor de Cd nos ensaios

Controlo e nos ensaios ArCd, são também observadas diferenças estatísticas tal como esperado (valor $p = 0,0074$; teste t).

É de referir ainda, o valor elevado registado para os ensaios irrigados com ArNi, que tal como é dito em cima pode dever-se a uma contaminação no processo de irrigação. Como as plantas do genótipo *M. floridulus* não desenvolveram panícula, não serão discutidas.

Tabela 3.32: Teor de Cádmio na panícula (mg (Cd)/ kg matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	0,011±0,009	0,245±0,048	0,159±0,050
<i>M. sinensis</i>	nd	0,356±0,066	0,134±0,098
<i>M. floridulus</i>	-	-	-

(Nd) não detectável

As duas restantes componentes analisadas serão a biomassa não *Miscanthus* (tabela 3.33) e a manta morta (tabela 3.34).

Em ambas, o teor de Cd calculado, é o superior para os ensaios irrigados com água residual contaminada com este metal pesado. O teor mais elevado (mg (Cd)/ kg matéria seca) obtém-se para o *M. floridulus* na biomassa não *Miscanthus* e para o *M. x giganteus* na manta morta, 1,949 e 1,127 respectivamente. Em nenhuma das fracções há diferenças estatísticas significativas quer entre contaminações, quer entre as espécies de *Miscanthus* que tenham desenvolvido as fracções em causa.

Tabela 3.33: Teor de Cádmio na biomassa não *Miscanthus* (mg (Cd)/ kg matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	-	-	-
<i>M. sinensis</i>	nd	0,548±0,098	0,129*
<i>M. floridulus</i>	nd	1,949*	0,078*

(Nd) não detectável

Tabela 3.34: Teor de Cádmio na manta morta (mg (Cd)/ kg matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	nd	1,127*	-
<i>M. sinensis</i>	nd	-	-
<i>M. floridulus</i>	nd	0,698*	-

(Nd) não detectável

3.3.3.4.2. Níquel

O níquel é um nutriente essencial para o normal desenvolvimento da planta. O Ni é um componente chave de certas enzimas envolvidas no metabolismo e fixação biológica do azoto. As concentrações de níquel superiores a 10 mg/kg, são geralmente consideradas como sendo tóxicas para as plantas, por consequência, um elevado nível de contaminação de níquel nas

águas de irrigação pode ser prejudicial. Os resultados para o teor de Ni (figura 3.16) foram bastante semelhantes aos obtidos para o conteúdo de Cd.

Tabela 3.35: Teor de Níquel nos caules (mg (Ni)/ kg matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	1,62±0,23	0,288*	0,712±0,563
<i>M. sinensis</i>	3,16±0,29	0,587±0,330	3,080±1,888
<i>M. floridulus</i>	0,374*	1,241±0,081	2,103±0,408

*(por falta de amostra, devido a fatores externos, apenas foi realizada uma determinação)

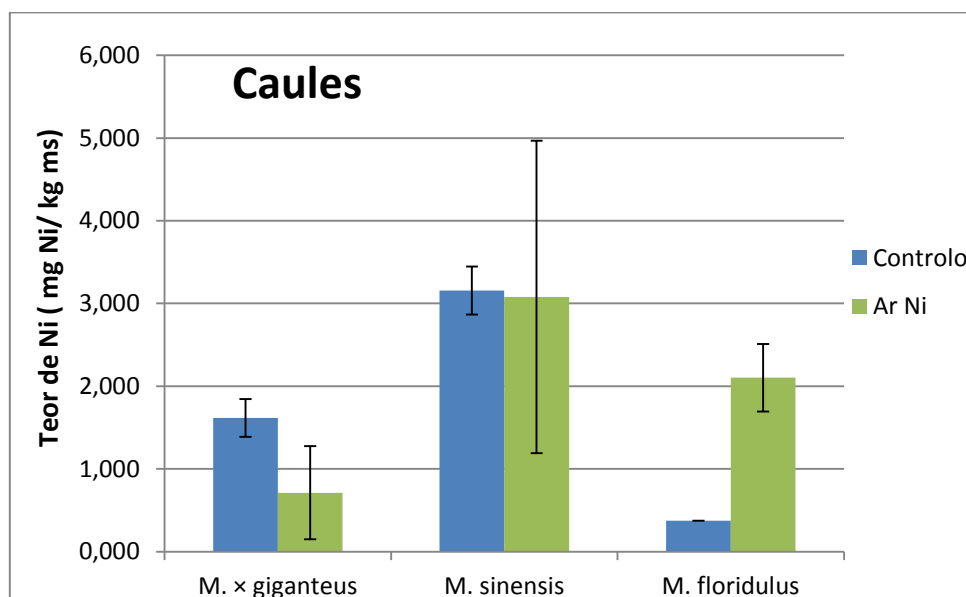


Figura 3.16: Teor médio de Níquel nos caules de *Miscanthus* (mg Ni / kg de matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação

Não se verificam diferenças significativas no estudo estatístico do teor de Ni nos caules de *Miscanthus* (tabela 3.35) quer entre os três genótipos (valor $p=0,11$; ANOVA), quer entre as três irrigações (valor $p=0,112$; ANOVA). Como maneira de comprovar, aplicou-se o teste t, não verificando diferenças, tal como esperado depois de verificado o resultado do ANOVA.

Os dois valores mais elevados são registados na família de *M. sinensis* para a irrigação Controlo (3,157 mg Ni/ kg ms) e para a irrigação ArNi (3,080 mg Ni/ kg ms), por sua vez, os mais reduzidos são registados nas famílias *M. x giganteus* (0,288 mg Ni/ kg ms – ArCd) e *M. floridulus* (0,374 mg Ni/ kg ms – Controlo). O valor mais elevado ter sido registado para o ensaio Controlo, ou seja não contaminado com o metal pesado, pode dever-se ao facto deste metal ser essencial para o normal desenvolvimento da planta e de as plantas deste ensaio, o terem captado de forma eficaz (Liu, 2001).

Os valores que possam demonstrar ocorrência de deficiência de Ni por parte das plantas, principalmente para *M. x giganteus* (caules) irrigado com ArNi (0,712 mg Ni/kg de

matéria seca), pode estar associada a solos que tenham recebido excessivas aplicações de Zn, Cu, Mn, Fe, Ca ou Mg (Brown, 2006). Tal como referido anteriormente, os *Miscanthus* estudados sofreram contaminações de Zn e Cu no primeiro ano de estabelecimento. No caso concreto em discussão, o ensaio *M. x giganteus* (ArNi) sofreu contaminação com Cu.

As plantas irrigadas com águas residuais contaminadas com Ni parecem acumular um maior teor médio de metal pesado, que o mesmo valor registado para os vasos Controlo. Isto é particularmente significativo para as folhas (tabela 3.36), onde se registam diferenças estatísticas entre as irrigações Controlo e ArNi ($p = 0,0103$; teste t). Não são encontradas diferenças estatisticamente significativas entre genótipos para o teor de Ni no entanto, a família de *M. floridulus* irrigada com a água residual apresenta maiores teores de Ni que os dois genótipos restantes, também irrigados com a água residual. As folhas são a fracção que apresenta teores de Ni mais elevados (figura 3.17).

Tabela 3.36: Teor de Níquel nas folhas (mg (Ni)/ kg matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	1,04±0,57	0,575±0,335	4,76±2,80
<i>M. sinensis</i>	0,128±0,001	1,63±0,08	3,56±1,09
<i>M. floridulus</i>	1,50±0,28	0,818±0,270	8,52±0,72

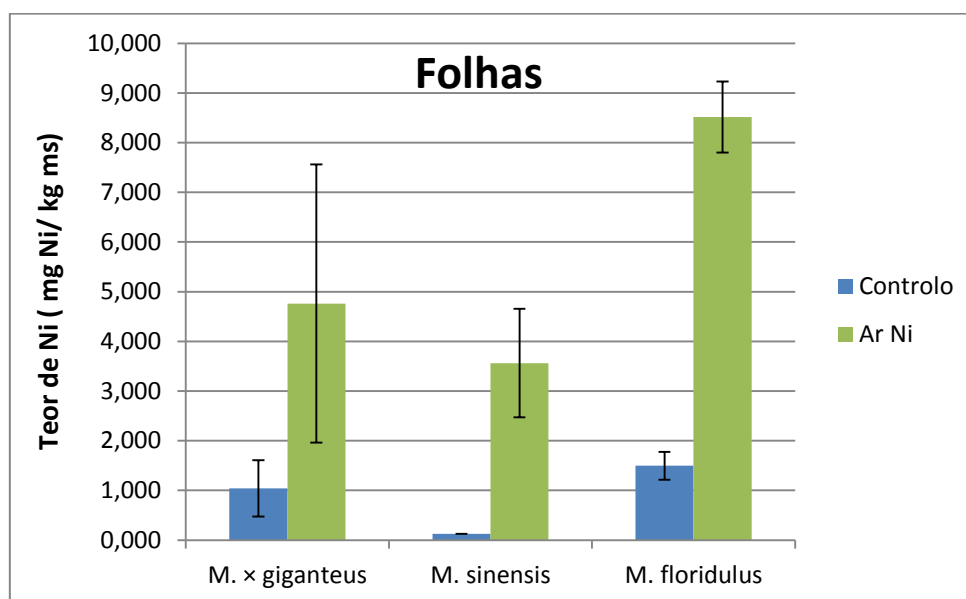


Figura 3.17: Teor médio de Níquel nas folhas de *Miscanthus* (mg Ni/kg de matéria seca) para os diferentes tipos de irrigação

O teor de Níquel foi analisado ainda para as fracções seguintes: panícula e biomassa não *Miscanthus*. Para nenhuma das fracções indicadas foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre espécies nem entre contaminações. Os ensaios de *M. floridulus* não

desenvolveram panícula pelo que não serão discutidos. Ainda assim, verificam-se resultados passíveis de discussão.

De notar o elevado valor de teor de Ni registado para o *M. sinensis* nas panículas analisadas dos ensaios Controlo (tabela 3.37). O valor de 8,143 mg Ni/kg ms, parece causado por uma contaminação pois trata-se de um resultado isolado e de mais do dobro da concentração verificada para o segundo maior valor registado de teor de Ni.

Tabela 3.37: Teor de Níquel na panícula (mg Ni/kg matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	1,69±0,09	1,39±0,45	0,811±0,682
<i>M. sinensis</i>	8,14*	nd	1,33*
<i>M. floridulus</i>	-	-	-

*(por falta de amostra apenas foi realizada uma determinação) – nd (não detectável)

Na biomassa não *Miscanthus* recolhida e analisada de modo a calcular o teor de Ni (tabela 3.38), verifica-se também um ensaio passível de contaminação. Neste caso, a contaminação pode surgir de uma excessiva irrigação com as águas residuais contaminadas com Ni. Outra justificação pode ser a capacidade de fitoextração elevada da biomassa não *Miscanthus*, sendo interessante de identificar a natureza das mesmas como proposta futura. Interessante destacar o comportamento idêntico da biomassa não *Miscanthus* recolhida dos ensaios irrigados com água da rede, sugerindo possibilidade de naturezas idênticas entre si.

Tabela 3.38: Teor de Níquel na biomassa não *Miscanthus* (mg Ni/kg matéria seca)

	Controlo	Ar Cd	Ar Ni
<i>M. x giganteus</i>	-	-	-
<i>M. sinensis</i>	3,503±1,030	0,079±0,026	1,220*
<i>M. floridulus</i>	3,701*	1,355*	8,985*

*(por falta de amostra apenas foi realizada uma determinação) – nd (não detectável)

3.3.3.5. Fibra Total

Para um aproveitamento eficaz dos materiais lenhocelulósicos e do *Miscanthus* em particular, é necessária uma caracterização criteriosa dos seus componentes estruturais (celulose, hemicelulose e lenhina). Consoante a origem do material, tipo de cultura e condições da mesma, existe uma variação na proporção relativa destes três componentes.

O conhecimento da composição química do material utilizado é fundamental para calcular os rendimentos dos vários componentes obtidos mas também para a compreensão da forma como a irrigação com águas residuais contaminadas com os metais pesados em questão pode ter influência na qualidade da biomassa. Esta análise torna-se ainda muito importante

numa perspectiva de valorização energética, como por exemplo para as indústrias da pasta para papel e para a produção de energia (Fernando, 2005).

Na tabela 3.39 é apresentado o teor de fibra e seus constituintes para cada genótipo.

Tabela 3.39: Teor de fibra e seus constituintes para cada genótipo (% matéria seca)

	<i>M. x giganteus</i>	<i>M. sinensis</i>	<i>M. floridulus</i>
Celulose	37,96±3,34	37,53±1,15	40,35±0,66
Hemicelulose	20,60±1,65	21,26±0,15	20,05±0,42
Lenhina	22,96±0,31	19,45±0,11	21,80±0,58
Fibra total	91,34±0,83	88,50±3,00	90,02±1,95

A celulose aparece como o principal componente estrutural da biomassa de *Miscanthus spp.*, ao passo que a lenhina e a hemicelulose apresentam valores idênticos. Os teores de celulose e de hemicelulose confirmam a elevada percentagem de polissacáridos (~60 %), desta matéria-prima estando de acordo com outros estudos relativos à sua composição (Zhang *et al.*, 2012; Laskar *et al.*, 2013; Lygin *et al.*, 2011) e sendo favorável à sua posterior valorização energética.

Os valores mais elevados para a celulose (40,35±0,66 %), hemicelulose (21,26±0,15 %) e lenhina (22,96±0,31 %) foram obtidos para *M. floridulus*, *M. sinensis* e *M. x giganteus*, respectivamente. O teor mais elevado de fibra total foi obtido para o *M. x giganteus* (91,34±0,83 %).

Não se verificam diferenças estatisticamente significativas no teor de fibra e seus constituintes para os diferentes tipos de irrigação, pelo que os resultados obtidos não são apresentados. Por outro lado, o fato de não se terem verificado diferenças, indica que a biomassa pode ser irrigada com estas águas sem se verificar alterações na qualidade da biomassa (em termos de teores lenhocelulósicos).

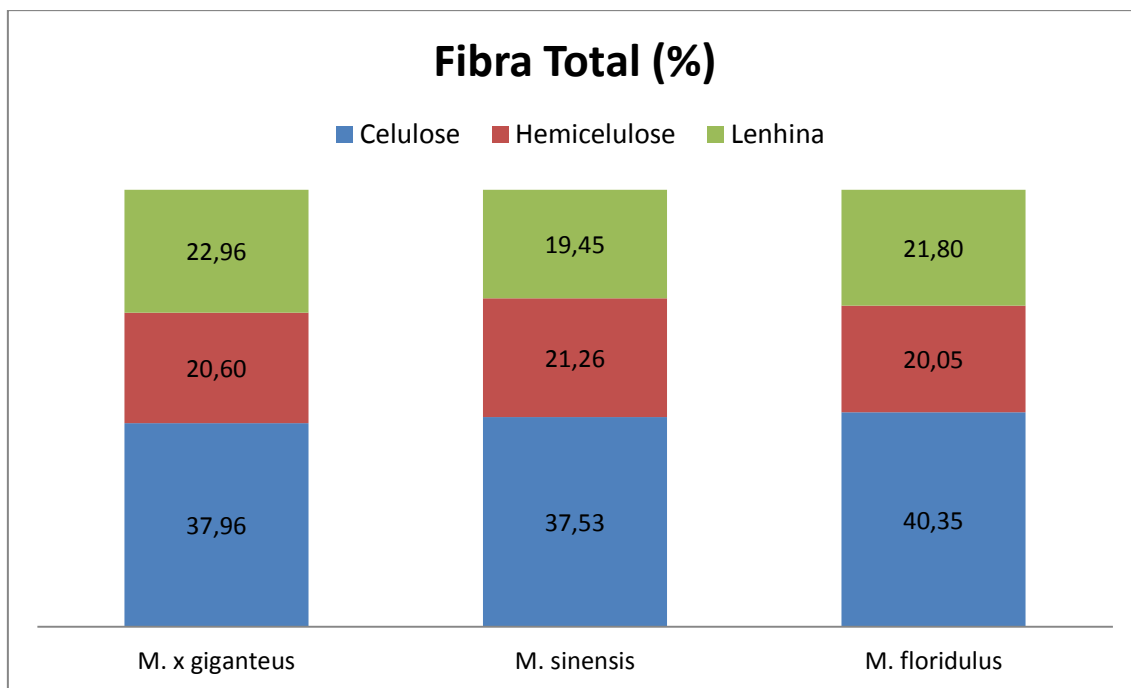


Figura 3.18: Percentagem de fibra total para cada genótipo em estudo

3.4. Caracterização do Solo

3.4.1. Parâmetros físico-químicos

De seguida é feita uma caracterização do solo através de uma série de criteriosas análises físico-químicas (tabela 3.40), de modo a perceber a influência que o mesmo pode ter tido no normal crescimento da planta e ao mesmo tempo a influência que as águas residuais contaminadas com metais pesados (mais propriamente Cd e Ni) tiveram na qualidade do solo.

A utilização de águas residuais na irrigação é, não só, uma fonte valiosa de nutrientes para a planta, mas é também importante para manter fertilidade e elevada produtividade do solo, pela forte presença de matéria orgânica na sua composição (Meli *et al.*, 2002; Rusan *et al.*, 2007). Contudo, Vazquez-Montiel *et al.* (1996) não detectaram efeitos positivos da utilização de águas residuais no conteúdo em matéria orgânica no solo. Sendo assim, os benefícios da irrigação de CE com águas residuais devem ser alvo de futura investigação científica com o objectivo de avaliar os rendimentos energéticos e de biomassa, e efeito que tem no solo. É importante destacar a possibilidade de as águas residuais danificarem as propriedades físico-químicas do solo, como por exemplo: a degradação da estrutura, decréscimo da condutividade, redução no arejamento do solo (Bhardwaj *et al.*, 2007).

Tabela 3.40: Parâmetros físico-químicos do solo 0-20 cm (superior)

	Genótipo	pH	Condutividade ($\mu\text{s}/\text{cm}$)
Controlo	<i>M. x giganteus</i>	$8,3 \pm 0,4$	492 ± 23
	<i>M. sinensis</i>	$7,7 \pm 0,2$	436 ± 48
	<i>M. floridulus</i>	$8,0 \pm 0,2$	450 ± 90
ArCd	<i>M. x giganteus</i>	$7,2 \pm 0,4$	377 ± 128
	<i>M. sinensis</i>	$7,3 \pm 0,5$	300 ± 128
	<i>M. floridulus</i>	$7,5 \pm 0,4$	558 ± 158
ArNi	<i>M. x giganteus</i>	$7,5 \pm 0,3$	476 ± 258
	<i>M. sinensis</i>	$7,4 \pm 0,4$	486 ± 56
	<i>M. floridulus</i>	$7,5 \pm 0,2$	632 ± 328

É muito importante estudar o pH do solo pois este é um excelente indicador das propriedades químicas do solo, isto porque variações de pH podem interferir na disposição de vários elementos químicos essenciais ao desenvolvimento vegetal. Por exemplo, condições muito ácidas podem resultar na dissolução de elementos como o ferro, alumínio e o manganês, fazendo com que haja a possibilidade de se tornarem tóxicos. Valores de pH elevados (>8), interferem com a normal assimilação de elementos como o zinco, dificultando o crescimento da planta (Brady, 1983).

Quanto aos resultados para os parâmetros físico-químicos do solo superior, pela análise da tabela 3.40, observamos a descida do pH do solo superior aquando da utilização das águas residuais como irrigação. Em todos os génotipos verificam-se valores de pH superiores para os vasos irrigados com águas residuais ricas em Ni, quando comparados com os vasos irrigados com águas residuais ricas em Cd. Esta conclusão vai contra o defendido por Zema *et al.* (2012), que acredita não haver mudança no pH do solo por influência da irrigação com águas residuais, o que pode sugerir a influência da contaminação com metais pesados neste parâmetro. Contudo, a literatura não é unânime. O decréscimo registado para o pH nos ensaios ArNi em relação aos dados registados nos ensaios Controlo, é devido ao facto de o Ni se encontrar no solo sob a forma de $\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$. A sua actividade diminuiu com o aumento do pH e também com a interacção com compostos orgânicos e inorgânicos (Mellis *et al.*, 2004).

O caso onde se verifica uma maior diferença entre os dois valores, é o do génotipo *M. x giganteus* (ArCd – 7,18; ArNi – 7,53). O resultado referido na frase anterior dos ensaios ArCd foi o mais baixo a ser verificado neste estudo, por sua vez, o pH mais elevado a ser registado para os ensaios irrigados com águas residuais é o verificado para o *M. floridulus* (ArNi).

A condutividade é um parâmetro utilizado para avaliar a quantidade de sais presentes numa certa solução de solo. Quanto maior for a quantidade de sais presentes na solução, maior será a condutividade obtida.

Não parecem haver diferenças significativas entre contaminações, para a condutividade detectada no solo superior dos ensaios em estudo. Por outro lado, parecem haver diferenças de comportamento entre genótipos. O genótipo *M. floridulus* apresenta valores de condutividade no solo superior, consideravelmente superiores aos registados para os dois restantes genótipos. O valor mais elevado é então registado no genótipo referido, para os vasos irrigados com água da rede (Controlo - 1850 $\mu\text{S}/\text{cm}$), Zema *et al.* (2012) detectou o contrário, ou seja, condutividade superior nos ensaios irrigados com águas residuais. A produtividade média obtida para as folhas dos *M. floridulus* em estudo (ponto 3.3.1.4), pode estar relacionada com os resultados detectados para a condutividade, isto porque, Tomé Jr (1997) afirma que o excesso de sais na zona radicular, pode prejudicar o desenvolvimento e produtividade das plantas. A justificação da frase anterior é reforçada através da análise dos dados recolhidos para a condutividade do solo superior dos vasos de *M. x giganteus*, pois este é o genótipo com os melhores resultados de produtividade média e registou valores reduzidos de condutividade.

Tabela 3.41: Parâmetros físico-químicos do solo 20-40 cm (inferior)

	Genótipo	pH	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Controlo	<i>M. x giganteus</i>	7,9 \pm 0,2	368 \pm 80
	<i>M. sinensis</i>	7,4 \pm 0,2	523 \pm 43
	<i>M. floridulus</i>	8,1 \pm 0,4	413 \pm 126
ArCd	<i>M. x giganteus</i>	8,0 \pm 0,4	311 \pm 128
	<i>M. sinensis</i>	7,6 \pm 0,2	321 \pm 118
	<i>M. floridulus</i>	7,6 \pm 0,1	338 \pm 165
ArNi	<i>M. x giganteus</i>	8,0 \pm 0,3	364 \pm 108
	<i>M. sinensis</i>	7,9 \pm 0,4	392 \pm 85
	<i>M. floridulus</i>	7,3 \pm 0,2	410 \pm 72

No caso do solo inferior (20-40 cm), os resultados verificados para o pH são semelhantes entre si, não parecendo haver diferenças significativas quer entre contaminações, quer entre genótipos. Vários autores defendem a inexistência de influência a curto prazo das águas residuais, no pH do solo (Alhands *et al.*, 1995; Heidarpour *et al.*, 2007; Rusan *et al.*, 2007), estando portanto de acordo com os resultados expostos na tabela 3.41.

Tanto o valor mais elevado como o mais reduzido, são registados para a família de *M. floridulus*, sendo 7,27 – ArNi e 8,06 – Controlo. Para a família de *M. sinensis* nota-se um ligeiro aumento de pH nos ensaios irrigados com águas residuais em relação aos irrigados com água da rede, assim como para o *M. x giganteus* mas este com um aumento muito reduzido em relação ao Controlo (7,93).

Os resultados para o pH do solo foram, em todos os ensaios quer de solo superior, quer inferior, superiores a 6,7 o que pode estar associado à ocorrência de alguma deficiência na assimilação de Ni (Brown, 2006).

Tal como para o parâmetro estudado anteriormente, os resultados verificados para a condutividade não indicam a existência de diferenças significativas quer entre contaminações, quer entre genótipos. Mesmo não sugerindo diferenças, os valores registados para os ensaios Controlo, são superiores aos registados para os ensaios das águas residuais contaminadas com os metais pesados em estudo. O valor de condutividade mais elevado do solo inferior regista-se para a família *M. sinensis* (523 $\mu\text{S}/\text{cm}$), ao contrário do verificado para o solo superior onde foi a família *M. floridulus* a registar valores manifestamente elevados em relação aos restantes.

3.4.2. Carbono Orgânico

Os resultados obtidos para o teor de carbono orgânico estão expostos nas tabelas 3.42 e 3.43, sendo a primeira referente aos resultados do solo inferior e a segunda dos resultados referentes ao solo superior. Este é um importante parâmetro para avaliar a qualidade do solo, pois é a principal fonte de energia para os microorganismos presentes no solo (Edwards *et al.*, 1999).

Tabela 3.42: Teor de carbono orgânico - solo inferior (20-40 cm) (% , matéria seca)

	Controlo	ArCd	ArNi
<i>M. x giganteus</i>	0,49 \pm 0,08	0,38 \pm 0,13	0,31 \pm 0,06
<i>M. sinensis</i>	0,21 \pm 0,10	0,38 \pm 0,10	0,22 \pm 0,11
<i>M. floridulus</i>	0,41 \pm 0,03	0,30 \pm 0,09	0,56 \pm 0,17

No solo inferior, parece existir um ligeiro decréscimo do teor de carbono orgânico nos ensaios irrigados com águas residuais. Excepção feita para o caso do genótipo *M. sinensis* quando irrigado com a água residual contaminada com Cádmio (0,4309), os valores para o Controlo e para ArNi são muito semelhantes. A maior diferença é registada para o *M. floridulus*, em que o valor Controlo chega a ser quatro vezes superior ao registado para ArCd e o dobro do registado para ArNi. No caso do *M. x giganteus*, os valores são próximos, mas nota-se o referido decréscimo em relação aos ensaios irrigados com água da rede.

Para o solo superior, tal como no solo inferior e como no estudo de Zema *et al.* (2012) onde é avaliada a fracção 0-30 cm, parece existir um ligeiro decréscimo do teor de carbono orgânico nos ensaios irrigados com águas residuais. Excepção feita para o caso do genótipo *M. floridulus*, que registou um teor de C orgânico de 0,7276 (ArNi), superior aos 0,4094 registados no Controlo.

Tabela 3.43: Teor de carbono orgânico - solo superior (0-20 cm) (% matéria seca)

	Controlo	ArCd	ArNi
<i>M. x giganteus</i>	0,59 ± 0,08	0,52 ± 0,18	0,39 ± 0,06
<i>M. sinensis</i>	0,38 ± 0,11	0,34 ± 0,10	0,31 ± 0,08
<i>M. floridulus</i>	0,41 ± 0,03	0,34 ± 0,10	0,63 ± 0,18

3.4.3. Metais

As figuras 3.19 e 3.20 exibem os teores de Cd e Ni, respectivamente, presente nas fracções de solo recolhidas em Janeiro. Amostras representativas da fracção superior (0-20 cm) e da fracção inferior (20-40 cm), foram recolhidas e analisadas.

Os resultados demonstram que os solos dos ensaios irrigados com águas residuais contaminadas com Cd/Ni apresentam maior teor de Cd/Ni, que os solos provenientes dos ensaios irrigados com água da rede. Isto demonstra a possibilidade de enriquecimento dos solos com alguns poluentes, ao serem irrigados com águas residuais contaminadas. Os resultados indicam ainda que a acumulação de Cd/Ni, é maioritária na fracção superior do solo (0-20 cm).

Relativamente à contaminação com Cd, não são observadas diferenças significativas entre os ensaios de *M. x giganteus* e *M. sinensis* (figura 3.19), os vasos de *M. floridulus* irrigados com a ArCd apresentam maior acumulação de Cd no solo que os dois genótipos restantes. Os resultados obtidos indicam que o *M. floridulus* apresenta menor capacidade para captar Cd das águas residuais, por comparação com *M. x giganteus* e com o *M. sinensis*, embora estatisticamente essas diferenças não sejam significantes. Regista-se na família de *M. floridulus*, o teor de Cd mais elevado para os solos - tanto inferior, como superior – de 10,44 mg Cd/kg ms.

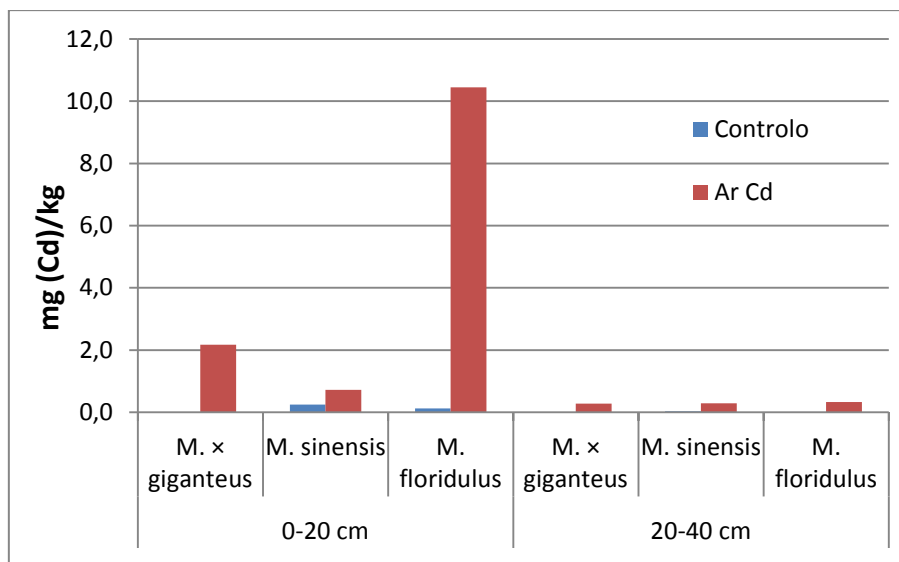


Figura 3.19: Teor médio de Cádmio no solo – superior e inferior (mg Cd/kg ms) para os diferentes genótipos

Em relação à contaminação de Ni no solo (figura 3.20), não se observam diferenças estatísticas significativas entre genótipos, mas sim entre contaminações no solo superior (valor $p=0,0036$; ANOVA). O valor de teor de Ni mais elevado regista-se para o *M. sinensis* nas amostras de solo superior (44 mg Ni/kg ms). É importante destacar a natureza heterogénea do solo e que a recolha da amostra é um importante passo para a sua caracterização. Ainda assim, foram feitos esforços de modo a obter amostras homogéneas.

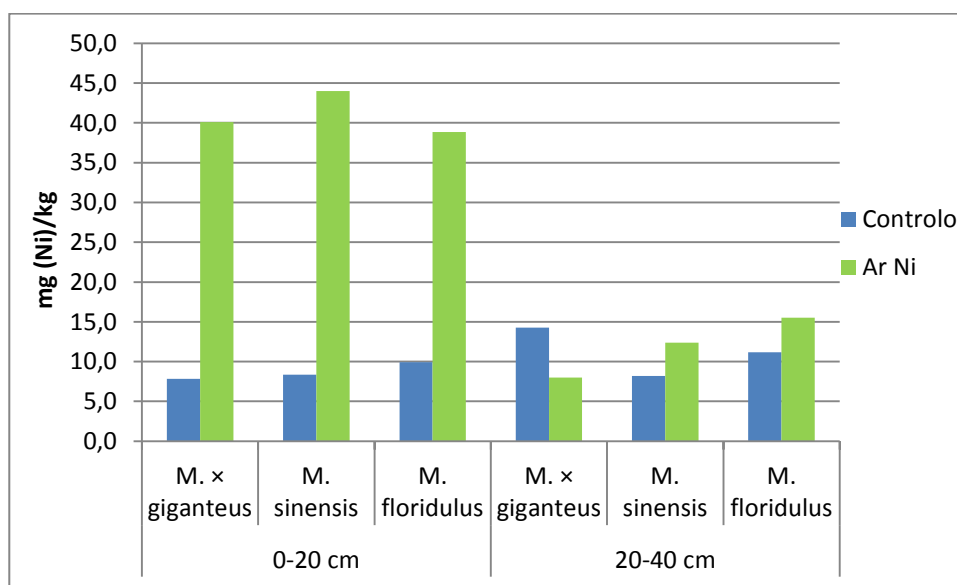


Figura 3.20: Teor médio de Níquel no solo – superior e inferior (mg Ni/kg ms) para os diferentes genótipos

Conclusão

A irrigação com águas residuais contaminadas com Cd e Ni não afectou a produtividade dos três genótipos de *Miscanthus* em estudo e que o *M. x giganteus* e o *M. floridulus* registaram produtividades mais elevadas que o *M. sinensis*. Contudo, *M. x giganteus*, demonstrou uma tendência para redução da sua produtividade com a contaminação de Cd.

A biomassa irrigada com águas residuais contaminadas apresentou maior teor de Cd e Ni, do que a biomassa dos ensaios controlo.

Os três genótipos estudados demonstram capacidade acumuladora de Cd e Ni.

Na biomassa, a acumulação ocorreu de uma maneira mais acentuada nas folhas do que nos caules, no que diz respeito ao Ni. No caso do Cd, não são detectadas diferenças entre fracções.

O sistema *Miscanthus*-solo registou valores de remoção de Cd de 100%. No caso do *M. x giganteus* e do *M. sinensis* obteve-se a remoção de Ni de 96-100% proveniente das águas residuais. O *M. floridulus*, contudo, demonstrou menos potencial de fitorremediação no que diz respeito à remoção de Ni das águas residuais: apenas 58% de Ni foi removido pelo sistema “biofiltrador”.

A acumulação de Cd/Ni na camada superior do solo demonstra que a irrigação com águas residuais contaminadas com estes metais deve ser controlada, de modo a evitar impactes negativos no ambiente.

As contaminações em estudo não afectaram a qualidade da biomassa, no que diz respeito aos teores de celulose, hemicelulose e lenhina.

Propostas futuras:

Estudo do scale-up do processo (terreno).

Estudo da capacidade de resposta do sistema planta-solo à fitorremediação com [Cd] / [Ni] mínimas e máximas.

Estudo da capacidade de resposta do sistema planta-solo à fitorremediação da mistura dos metais pesados em estudo.

Estudo da qualidade e comportamento do sistema rizomatoso.

Avaliar o potencial da biomassa no conceito de biorrefinaria.

Bibliografia

Alhands M.N., Allick S.A., Overman A.R., Leseman W.G., Vidak W., (1995) Municipal water reuse at Tallahassee, Florida. Transactions of the ASAE 38 (2), 411–418.

Ali H., Khan E., Sajad M.A. (2013), Phytoremediation of heavy metals – Concepts and applications, Peshwar, Pakistan;

AOAC (1990) Official Methods of Analysis. Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs. Volume I, 15th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, EUA, 1213 p.

APHA, AWWA e WPCF (1985) Standard Methods for the examination of water and wastewater. 16th Ed. American Public Health Association, American Water Works Association e Water Pollution Control Federation, Washington D.C., EUA, p 1268.

Arduini I., Masoni A., Ercoli L. (2005) Effects of high chromium applications on *Miscanthus* during the period of maximum growth. Environmental and Experimental Botany 58, 234–243.

Arduini I., Masoni A., Ercoli L. (2006) Effects of high chromium applications on *Miscanthus* during the period of maximum growth. Environmental and Experimental Botany 58, 234–243.

Arduini I., Masoni A., Mariotti M., Ercoli L. (2004) Low cadmium application increase miscanthus growth and cadmium translocation. Environmental and Experimental Botany, 52, 89-100.

Arnoult S., Quillet M. & Brancourt-Hulmel M. (2014) *Miscanthus* Clones Display Large Variation in Floral Biology and Different Environmental Sensitivities Useful for Breeding - Bioenerg. Res.,7, 430–441.

Asner, G.P.; Scurlock, J.M.O.; Hicke, J.A. (2003) Global synthesis of leaf area index observations: implications for ecological and remote sensing studies. Global Ecology and Biogeography, Oxford, v.12, p.191-205.

Avice, J.C., Lemaire, G., Ourry, A., Boucaud, J., (1997). Effects of the previous shoot removal frequency on subsequent shoot regrowth in two *Medicago sativa* L. cultivars. Plant and Soil 188, 189–198.

Baize, D. (2000) Guide des analyses en pedologie. 2ª Edição, revista e aumentada. INRA editions, Paris, França, 257 p.

Bhardwaj AK, Goldstein D, Azenkot A, Levy GJ (2007) Irrigation with treated wastewater under two different irrigation methods: Effects on hydraulic conductivity of a clay soil. Geoderma, 140, 199-206.

Barbosa B., Costa J., Fernando A.L., Papazoglou E.G. (2014) Wastewater reuse for fiber crops cultivation as a strategy to mitigate desertification, Industrial Crops and Products, available on line (DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.07.007).

Barney J.N., Ditomaso J.M. (2008) Nonnative species and bioenergy: are we cultivating the next invader? Bioscience, 58:64-70.

Baxter L.L. (1993) Ash deposition during biomass and coal combustion: A mechanistic approach. *Biomass Bioenergy*; 4(2):85–102.

Baxter X.C., Darvell L.I., Jones J.M., Barraclough T., Yates N.E., Shield I. (2011) Study of *Miscanthus x giganteus* ash composition – Variation with agronomy and assessment method. *Fuel*, 95, 50–62.

Beale CV, Long SP. (1995) Can perennial C4 grasses attain high efficiencies of radiant energy conversion in cool climates. *Plant, Cell and Environment*. 18:641, 50.

Beale CV, Long SP. (1997) The effects of nitrogen and irrigation on the productivity of C4 grasses *Miscanthus x giganteus* and *Spartina cynosuroides*. *Aspects of Applied Biology*;49:225–30.

Beale CV, Morison JIL, Long SP. (1999) Water use efficiency of C4 perennial grasses in a temperate climate. *Agriculture and Forest Meteorology*;96:103–15.

Belanger, G., Gastal, F., Lemaire, G., (1992). Growth analysis of a tall fescue sward fertilized with different rates of nitrogen. *Crop Science* 32, 1371–1376.

Biewinga, E., van der Bijl, G. (1996) Sustainability of energy crops in Europe. A methodology developed and applied, Centre for Agriculture and Environment, Utrecht, February, CLM 234, pp 209.

Boatwright G.O.; Viets Jr., F.G. (1966) Phosphorus absorption during various growth stages of spring wheat and intermediate wheatgrass. *Agronomy Journal*, v.58, p.185–188.

Boléo, S. (2011) Environmental impact assessment of energy crops cultivation in the Mediterranean Europe. Thesis submitted for the Degree of Master in Energy and Bioenergy. FCT/UNL.

Bozell J. J., Holladay J. E., Johnson D., White J. F. (2007) Top value added chemicals, Volume II, Results of screening for potential candidates from biorefinery lignin, U.S. Department of Energy (DOE) Oak Ridge, TN, NREL e PNNL, PNNL-16983.

Brown, P. H. 2006. “Nickel.” In *Handbook of Plant Nutrition*, edited by A. V. Barker and D. J. Pilbeam, 395–410. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group.

Brady, N. C. (1983) *Natureza e Propriedades dos Solos*. Ed. Biblioteca Universitária Freitas Bastos. 6ª edição.

Brosse N., Sannigrahi P., Ragauskas A. (2009). Pretreatment of *Miscanthus x giganteus* Using the Ethanol Organosolv Process for Ethanol Production, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48, 8328–8334.

Bryers R.W. (1996) Fireside slagging, fouling, and high-temperature corrosion of heattransfer surface due to impurities in steam-raising fuels. *Prog Energy and Combust Sci*;22(1):29–120.

Carvalho F., Duarte L. C., Girio F. M. (2008) Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments, *J. Scientific Ind. Res.*, 67, 849–864.

Chaney RL. (1983). Plant uptake of inorganic waste. In *Land Treatment of Hazardous Waste*, eds JE Parr, PB Marsh, JM Kla, pp 50–76, Noyes Data Corp, Park Ridge NJ, pp. 50–76.

Chen, Hong, Cutright, Teresa, (2001) EDTA and HEDTA effects on Cd, Cr, and Ni uptake by *Helianthus annuus*. Chemosphere 45, 21–28.

Christian DG (1994) Quantifying the yield of perennial grasses grown as a biofuel for energy generation', Renewable Energy, vol 5, no 2, pp762–766.

Christian DG, Poulton PR, Riche AR, Yates NE. (1997) The recovery of N-15-labelled fertiliser applied to *Miscanthus x giganteus*. Biomass and Bioenergy; 12:21, 4.

Christian DG, Haase E (2001) Agronomy of *Miscanthus*. In: Jones MB, Walsh M, editors. *Miscanthus* for energy and fibre. London: James & James Ltd;. pp. 21 e 45.

Clifton-Brown JC, Lewandowski I. (1998) Frosttoleranz der Rhizome verschiedener *Miscanthus* Genotypen. Mitteilungen der Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften; 11, 225, 6.

Clifton-Brown J.C., Lewandowski, I. (2000) 'Overwintering problems of newly established *Miscanthus* plantations can be overcome by identifying genotypes with improved rhizome cold tolerance', New Phytol. 148(2), 287–294.

Clifton-Brown J.C., Lewandowski I. (2002) Screening *Miscanthus* genotypes in field trials to optimise biomass yield and quality in southern Germany. Eur J Agron;16, 97e100.

Clifton-Brown JC, Lewandowski I, Andersson B., Basch G., Christian D.G., Kjeldsen J.B. (2001) Performance of 15 *Miscanthus* genotypes at five sites in Europe. Agron J;93 (5):1013e9.

Clifton-Brown JC, Neilson BM, Jones MB. (1996) The potential of *Miscanthus* as an energy crop in Ireland. In: Chartier P, Ferrero GL, Henius UM, Hultberg S, Sachau J, Wiinblad M, editors. Biomass for energy and the environment: Proceedings of the Ninth European Bioenergy Conference, Copenhagen, Denmark, 24-27 June 1996. New York: Pergamon,. p. 628, 33.

Colnenne, C., Meynard, J.M., Roche, R., Reau, R., (2002). Effects of nitrogen deficiencies on autumnal growth of oilseed rape. European Journal of Agronomy 17, 11–28.

Dauber J, Brown C, Fernando AL, Finnan J, Krasuska E, Ponitka J, Styles D, Thrän D, Van Groenigen KJ, Weih M, Zah R (2012) Bioenergy from “surplus” land: environmental and socio-economic implications, BioRisk, 7, 5-50.

Decreto-lei nº 236/98 (1998) Normas, critérios e objetivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos, Diário da República nº 176, I Série-A, 1 de Agosto 1998, pp 3676-3722.

De-Jong W, Andries J, Hein KRG (1999) Coal/biomass co-gasification in a pressurised fluidised bed reactor. Renewable Energy, 16, 1110-1113.

De-Vrije T, de-Haas GG, Tan GB, Keijzers ERP, Claassen PAM (2002) Pretreatment of *Miscanthus* for hydrogen production by Thermotoga elfii. International Journal of Hydrogen Energy, 27, 1381 – 1390.

Diao, Y., Yu, Z., Hu, Z., (2011) Research advances on *Miscanthus* Anderss. Mod. Agr. Sci. Tech. 2, 265–268.

Dickinson, N.M., Pulford, I.D., (2005). Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evidence trail. *Environment International* 31, 609–613.

Dimitriou, I., Rosenqvist H. (2011). Sewage sludge and wastewater fertilization of Short Rotation Coppice (SRC) for increased bioenergy production biological and economic potential. *Biomass and Bioenergy*, 35, pp 835-842.

Dressler U-B. (1993) Produktivität, Wasserhaushalt und Nitratauswaschung von *Miscanthus sinensis* “Giganteus” (Riesenchinaschilf). *Mitteilungen der Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften*;6:201–4.

Dyckhoff, C., Halliwell, L., Haynes, R. e Watts, S. (1996) Sampling. In: Watts, S. and Halliwell, L. (eds), *Essential Environmental Science, Methods & Techniques*, Routledge, Londres, Reino Unido, pp 31-66.

Edwards J.H., C.W. Wood, D.L. Thurlow, and M.E. Ruf. (1999). Tillage and crop rotation effects on fertility status of a Hapludalf soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56:1577-1582.

Ehleringer JR, Monson RK (1993) Evolutionary and ecological aspects of photosynthetic pathway variation. *Annu Rev Ecol Syst* 24: 411–439.

El Bassam, N. (1998) *Energy plant species*. James & James (Science Publishers) Ltd, Londres, Reino Unido, 321 pp.

El Bassam, N. (2008) *Biomass from Miscanthus for Heat, Electricity and Transportation Fuel Generation*, IFEED Publication No 338.

El Bassam, N. (2010) *Handbook of Bioenergy Crops: A Complete Reference to Species, Development and Applications*. London, United Kingdom: Earthscan, Ltd 516 p.

El Bassam, N., Huisman, W. (2001) Harvesting and storage of *Miscanthus*. In: Jones, M.B. e Walsh, M. (eds), *Miscanthus for energy and fibre*, James & James (Science Publishers) Ltd, Londres, Reino Unido, pp 86-108.

Ercoli, L., Mariotti, M., Masoni, A., Bonari, E. (1999). Effect of irrigation and nitrogen fertilization on biomass yield and efficiency of energy use in crop production of *Miscanthus*. *Field Crops Research*, 63, pp 3 - 11.

Farage P.K., Blowers D.A., Long S.P., Baker N.R. (2006) Low growth temperatures modify the efficiency of light use by photosystem II for CO₂ assimilation in leaves of two chilling-tolerant C4 species, *Cyperus longus* L. and *Miscanthus x giganteus*. *Plant Cell Environ* 29: 720–728.

Fernando A., Oliveira J.S. (2004) Effects on Growth, Productivity and Biomass Quality of *Miscanthus x giganteus* of soils contaminated with heavy metals. In: Van Swaaij, W.P.M., Fjällström, T., Helm, P., Grassi, A. (eds) *Biomass for Energy, Industry and Climate Protection - Proceedings of the 2nd World Biomass Conference, 10-14 Maio 2004, Roma, Itália, ETA-Florence e WIP-Munich*, pp 387-390.

Fernando A.L., Duarte M.P., Almeida J., Boléo S., Mendes B. (2010) Environmental impact assessment of energy crops cultivation in Europe. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 4, 594–604.

Fernando A.L., Duarte M.P., Almeida J., Boléo S., Mendes B. (2011) Environmental Pros and Cons of Energy Crops Cultivation in Europe. In: Faulstich, M., Ossenbrink, H., Dallemand, J.F., Baxter, D., Grassi, A., Helm, P. (eds) Proceedings of the 19th European Biomass Conference and Exhibition, From Research to Industry and Markets. 6-10 June 2011, Berlin, Germany, Organized by ETA-Florence Renewable Energies and WIP-Renewable Energies, published by ETA-Florence Renewable Energies, pp 38-42.

Fernando A.L., Godovikova V., Oliveira J.F.S. (2004) *Miscanthus x giganteus*: Contribution to a Sustainable Agriculture of a Future/Present – Oriented Biomaterial. Materials Science Forum, Advanced Materials Forum II, 455-456-456, 437-441.

Fernando A.L., Oliveira J.F.S. (2005) Caracterização do potencial da planta *Miscanthus x giganteus* em Portugal para fins energéticos e industriais. Biologia Vegetal e Agro-Industrial, 2, 195-204.

Fernando, A.L.A.C. (2005) Fitorremediação por *Miscanthus x giganteus* de solos contaminados com metais pesados, dissertação de Doutoramento, FCT/UNL, Lisboa, 502 p.

Gao S., Niu Z., Huang N., Hou X. (2013) Estimating the Leaf Area Index, height and biomass of maize using HJ-1 and RADARSAT-2. International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation 24; 1–8.

Gastal F, Lemaire, G., (2002). N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. Journal of Experimental Botany 53, 789–799.

Glowacka, K. (2011) A review of the genetic study of the energy crop *Miscanthus*. Biomass Bioenergy 35, 2445-2454. DOI: 10.1016/j.biombioe.2011.01.041.

Greef JM. (1995) Etablierung und Biomassebildung von *Miscanthus x giganteus*. Göttingen, Germany: Cuvillier Verlag.

Greef, J. M., Deuter, M. (1993) 'Syntaxonomy of *Miscanthus x giganteus* Greef et Deu.', Angew. Bot., vol 67, pp87–90.

Haigh, M e Dyckhoff, C. (1996) Soils. In: Watts, S. and Halliwell, L. (eds), Essential Environmental Science, Methods & Techniques, Routledge, Londres, Reino Unido, pp 261-303.

Hartley, W., Dickinson, N. M., Riby, P., Lepp, N. W. (2009) Arsenic mobility in brownfield soils amended with green waste compost or biochar and planted with *Miscanthus*. Environmental Pollution 157, 2654–2662.

Hastings, A., Clifton-Brown, J., Wattenbach, M., Mitchell, C. P., Smith, P. (2009): The development of MISCANFOR, a new *Miscanthus* crop growth model: towards more robust yield predictions under different climatic and soil conditions. - Global Change Biology Bioenergy, 1, 2, p. 154-170.

Hayes DJ, Hayes MHB (2009) The role that lignocellulosic feedstocks and various biorefining technologies can play in meeting Ireland's biofuel targets. Biofuel, Bioproducts and Biorefining, 3, 500-520.

Heaton E. A., Dohleman F. G., Long S. P., Voigt T. V (2008a). Meeting U.S. biofuel goals with less land: the potential of *Miscanthus*. Global Change Biology 14, 2000-2014.

Heaton E. A., Flavell R. B., Mascia P. N., Thomas S. R., Dohleman F., Long S. (2008b) Herbaceous energy crop development: recent progress and future prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 202–209.

Heidarpour, M., Mostafazadeh-Fard, B., Abedi Koupai, J., Malekian, R., (2007) The effects of treated wastewater on soil chemical properties using subsurface and surface irrigation methods. *Agricultural Water Management* 90, 87–94.

Hodgson E.M., Lister S.J., Bridgwater A.V., Clifton-Brown J., Donnison I.S. (2010) Genotypic and environmentally derived variation in the cell wall composition of *Miscanthus* in relation to its use as a biomass feedstock. *Biomass Bioenergy*, 34:652-660.

Huang L., Zhuo J., Guo W., Spencer R., Zhang Z., Xu J. (2013) Tracing organic matter removal in polluted coastal waters via floating bed phytoremediation. *Marine Pollution Bulletin* 71, 74–82

Iqbal, M.P., 2012. Lead pollution—a risk factor for cardiovascular disease in Asian developing countries. *Pak. J. Pharm. Sci.* 25, 289–294.

ISO 5664 (1984) Water quality – Determination of ammonium – Distillation and titration method.

ISO 5667-3 (1985) Water quality – Sampling - Part 3: Guidance on the preservation and handling of samples.

ISO 5815-1 (2003) Water quality -- Determination of biochemical oxygen demand after n days (BOD_n) - Part 1: Dilution and seeding method with allylthiourea addition

ISO 5815-2 (2003) Water quality -- Determination of biochemical oxygen demand after n days (BOD_n) - Part 2: Method for undiluted samples

ISO 5961 (1994) Water quality – Determination of cadmium by atomic absorption spectrometry.

ISO 6777 (1984) Water quality – Determination of nitrite – Molecular absorption spectrometric method.

ISO 6878-1 (1986) Water quality – Determination of phosphorus – Part 1: Ammonium molybdate spectrometric method.

ISO 7888 (1985) Water quality – Determination of electrical conductivity.

ISO 7980 (1986) Water quality – Determination of calcium and magnesium – Atomic absorption spectrometric method.

ISO 8288 (1986) Water quality – Determination of cobalt, nickel, copper, zinc, cadmium and lead – Flame atomic absorption spectrometric methods.

ISO 8467 (1993) Water quality – Determination of permanganate index.

ISO 9174 (1990) Water quality – Determination of total chromium – Atomic absorption spectrometric methods.

ISO 9964 (1993) Water quality – Determination of sodium and potassium.

ISO 11466 (1995) Soil Quality – Extraction of trace metals soluble in aqua regia.

Iwaki H, Midorikawa B, Hogetsu K (1964) Studies on the productivity and nutrient element circulation in Kiragamine Grassland, central Japan. II. Seasonal change in standing crop. Botanical Magazine, Tokyo, 77, 447–457.

Jenkins, P., Southern, T., Truesdale, V., e Jeary, A. (1996) Waters. In: Watts, S. and Halliwell, L. (eds), Essential Environmental Science, Methods & Techniques, Routledge, Londres, Reino Unido, pp 305-350.

Jonckheere, I.; Fleck, S.; Nackaerts, K.; Muys, B.; Coppin, P.; Weiss, M.; Baret, F. (2004) Review Of Methods For In Situ Leaf Area Index Determination. Part I. Theories, Sensors and emispherical photography. Agricultural and Forest Meteorology, Amsterdam, v.121, p.19-35,

Jørgensen U. (2010) Benefits versus risks of growing biofuel crops:the case of *Miscanthus*. Current Opinions in Environmental Sustainability, 3, 1-7.

Juwarkar, AA; Jambhulkar, HP. (2008) Restoration of fly ash dump through biological interventions. ENVIRONMENTAL MONITORING AND ASSESSMENT. 139(1-3):355-365.

Kanai R, Edwards GE (1999) The biochemistry of C4 photosynthesis. In RF Sage, RK Monson, eds, C4 Plant Biology. Academic Press, San Diego, pp 49–87.

Khelfa A, Sharypov V, Fingueneisel G, Weber JV (2009) Catalytic pyrolysis and gasification of *Miscanthus Giganteus*: Haematite (Fe₂O₃) a versatile catalyst. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 84, 84-88.

King, D. A., Loucks O. L. (1978) The theory of tree bole and branch form. Radiation and Environmental Biophysics 15: 141–165.

Kirkham M.B. (2006) Cadmium in plants on polluted soils: effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. Geoderma;137 (1-2), 19e32.

Klinke, H.B., Thomsen, A.B., Ahring, B.K., (2004) Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. Appl. Microbiol. Biotechnol. 66, 10–26.

Knoblauch, F., Tychsen, K. and Kjeldsen, J. B. (1991) *Miscanthus sinensis* ‘giganteus’ (elefantgræs), Landbrug Grøn Viden 85, [English version: Manual for Growing *Miscanthus sinensis* ‘Giganteus’, Danish Research Service for Plant and Soil Science, Institute of Landscape Plants, Hornum, Denmark].

Kuhad R. C., Singh A.. (1993) Lignocellulose biotechnology: current and future prospects, Crit. Rev. Biotech., 13, 151-172.

Kumar S., Gomes J.. (2008) Performance evaluation of reactors designed for bioconversion of wheat straw to animal feed, Animal Feed Sci. Technol., 144, 149-166.

Laskar D., Zeng J., Yan L, Chen S., Yang B. (2013) Characterization of lignin derived from water-only flowthroughpretreatment of *Miscanthus*. Industrial Crops and Products, 50, 391– 399

- Lehmann B, Schröder HW, Wollenberg R, Repke JU (2012) Effect of *Miscanthus* addition and different grinding processes on the quality of wood pellets. *Biomass and Bioenergy* 44, 150-159.
- Lewandowski, I., Clifton-Brown, J. C., Andersson, B., Basch, G., Christian, D. G., Jørgensen, U., Jones, M. B., Riche, A. B., Schwarz, K. U., Tayebi, K. and Teixeira, F. (2003). Environment and harvest time affects the combustion qualities of *Miscanthus* genotypes. *Agronomy Journal*, 95, pp 1274 – 1280.
- Lewandowski, I., Clifton-Brown, J.C., Scurlock, J.M.O., Huisman, W. (2000). *Miscanthus*: European experience with a novel energy crop. *Biomass and Bioenergy*, 19, pp 209 - 227.
- Lewandowski, I., Heinz, A., (2003). Delayed harvest of *Miscanthus* – influences on biomass quantity and quality and environmental impacts of energy production. *European Journal of Agronomy* 19 (1), 45–63.
- Lewandowski, I., Kicherer, A. (1997) Combustion quality of biomass: Practical relevance and experiments to modify the biomass quality of *Miscanthus* × *Giganteus*’, *Eur. J. Agron.* 6(3-4), 163–177.
- Li, J., Xia, N., (2011) Genetic diversity of *Miscanthus floridulus* (Poaceae) from Guangdong by Intersimple Sequence Repeat (ISSR). *J. Trop. Subtrop. Bot.* 19 (6),506–512
- Liphadzi, M.S., Kirkham, M.B., Mankin, K.R., Paulsen, G.M., (2003) EDTA-assisted heavy-metal uptake by poplar and sunflower grown at a long-term sewage-sludge farm. *Plant and Soil* 257, 171–182.
- Liu, G. D. (2001). “A New Essential Mineral Element – Nickel.” *Plant Nutrition and Fertilizer Science* 7(1):101–103.
- Liu, L. (1989) Plant resources of Gramineae: *Triarrhena*’, Unpublished manuscript.
- Liu, Q.; Mathanker, S. K.; Zhang, Q.; Hansen, A. C. (2012) Biomechanical properties of *Miscanthus* stems. *Journal Transactions of the ASABE* Vol. 55 No. 4 pp. 1125-1131.
- Lotfy S.M, Mostafa A.Z. (2013) Phytoremediation of contaminated soil with cobalt and chromium. *Journal of Geochemical Exploration*.
- LuciaNP., Essaid L., E. Iatan, (2011). Phytostabilization of actinidecontaminated soils (East Carpathians, Romania). *Geophysical Research Abstracts* 13, EGU2011–EGU7589.
- Lygin A. V., J. Upton, Frank G . Dohleman., Juvik J., Widholm J. And Lozovaya V. (2011) Composition of cell wall phenolics and polysaccharides of the potential bioenergy crop – *Miscanthus* - *GCB Bioenergy* - 3, 333–345.
- Machado, N.F.L., Calheiros, R., Gaspar, A., Garrido, J., Borges, F., Marques, M.P.M., (2008) Antioxidant phenolic esters with potential anticancer activity: solution equilibria studied by Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* 40, 80–85.
- Manahan, S. E. (1997) *Environmental Science and Technology*, Lewis Publishers, Boca Raton, New York, EUA, 624 p.

McIntyre T. (2003) Phytoremediation of heavy metals from soils. *Adv Biochem Eng Biotechnol*; 78, 97 e 123.

McLaughlin, S.B., R. Samson, D. Bransby, and A. Wiseloge. (1996) Evaluating physical, chemical and energetic properties of perennial grasses as biofuels. pp. 1-8. In *Bioenergy '96, Proceedings of the 7th National Bioenergy Conference, Nashville, Sept. 1996*.

Meli S., Porto M., Belligno A., Bufo S.A., Mazzatura A., Scopa A. (2012) Influence of irrigation with lagooned urban wastewater on chemical and microbiological soil parameters in a citrus orchard under Mediterranean condition, *Science of The Total Environment*, 285, 69-77.

Mellis, V.; Pessôa da Cruz, M.; Casagrande, J. (2004) Nickel adsorption by soils in relation to pH, organic matter, and iron oxides. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)* vol.61 no.2 Piracicaba.

Mench M., Bert V., Schwitzguébel J-P., Gawronski S., Schröder P., Vangronsveld J. (2009) Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: II. Outcomes at field scale and outlook from COST Action 859. *Journal of Soils and Sediments*, 10, 1039-1070.

Miles T.R. (1996) Boiler deposits from firing biomass fuels. *Biomass Bioenergy* ;10(2-3):125-38.

Monteiro J.E., Sentelhas C., Chiavegato E., Guiselini C., Santiago A., Pella A. (2005) Cotton Leaf Area Estimates Based On Leaf Dimensions And Dry Mass Methods. *Bragantia*, Campinas, V.64, N.1, P.15-24.

Monti A (2014) Summer School: Lignocellulosic Crops as Feedstock for Future Biorefineries, Costa da Caparica, 26-31 July 2014.

Mos M., Banks S.W., Nowakowski D.J., Robson P.R., Bridgwater A.V., Donnison I.S. (2013) Impact of *Miscanthus x giganteus* senescence times on fast pyrolysis bio-oil quality. *Bioresour Technol.* Feb; 129, 335-42.

Muchow R.C., Davis R., (1988). Effect of nitrogen supply on the comparative productivity of maize and sorghum in a semi-arid tropical environment II. Radiation interception and biomass accumulation. *Field Crops Research* 18, 17-30.

Neukirchen D. (1995) Nährstoffverlagerung in Rhizom und Wurzel sowie Nährstoffverluste über Herbst und Winter bei *Miscanthus x giganteus*. Diplomarbeit, Ruhr-Universität, Bochum, Germany,.

Niklas, K. J. (1998) The influence of gravity and wind on land plant evolution. *Review of Paleobotany and Palynology* 102: 1-14

NP 84 (1965) Solos. Determinação do teor de água. 2p.

O'Neill N.R., Farr D.F. (1996) *Miscanthus* blight, a new foliar disease of ornamental grasses and sugarcane incited by *Leptosphaeria* sp, and its anamorphic state *Stagonospora* sp. *Plant Disease*, 80, 980-987.

- Oliveira J.S., Duarte M.P., Christian D.G., Eppel-Hotz A., Fernando A.L. (2001) Environmental aspects of *Miscanthus* production. In: Jones, M.B and Walsh, M. (eds.), *Miscanthus for energy and fibre*. James & James (Science Publishers) Ltd, Londres, Reino Unido, pp 172-178.
- Ou, S.Y., Kwok, K.-C., (2004) Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1261–1269.
- Parveen, I., Winters, A., Threadgill, M.D., Hauck, B., Morris, P., (2008) Extraction, structural characterization and evaluation of hydroxycinnamate esters of orchard grass (*Dactylis glomerata*) as substrates for polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 69, 2799–2806.
- Pysek P, Sadlo J, Mandak B: Catalogue of alien plants of the Czech Republic. *Preslia* (2002), 74:97-186.
- Rusan MJM, Hinnawi S, Rousan L (2007) Long term effect of wastewater irrigation of forage crops on soil and plant quality parameters, *Desalination*, 215, 143-152.
- Sage RF (2004) The evolution of C4 photosynthesis. *New Phytol* 161: 341–370.
- Salt D.E., Smith R.D., Raskin I. (1998) phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 643–668.
- Sims REH, Hastings A., Schlamadinger B., Taylor G., Smith P. (2006) Energy Crops: current status and future prospects, *Global Change Biol.* 12, 1–23.
- Sims REH, Riddell-Black D (1998) Sustainable production of short rotation forest biomass crops using aqueous waste management systems. *Biomass and Bioenergy*, 15, 75-81.
- Singh OV, Labana S, Pandey G, Budhirahja R. (2003) Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Appl Microbiol Biotechnol*;61(5-6):405e12.
- Sinoquet, H.; Stephan, J.; Sonohat, G.; Lauri, P.É.; Monney, P.H. (2007) Simple equations to estimate light interception by isolated trees from canopy structure features: assessment with threedimensional digitized apple trees. *New Phytologist*, Cambridge, v.175, p.94-106.
- Sorensen A., Teller PJ, Hilstrom T, Ahring BK (2008) Hydrolysis of *Miscanthus* for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with wet explosion pre-treatment and enzymatic treatment. *Bioresource technology*, 99, 6602-6607.
- Sterck, F. J., Bongers F.(1998) Ontogenetic changes in size, allometry, and mechanical design of tropical rain forest trees. *American Journal of Botany* 85: 266–272.
- Strullu, L., Cadoux, S., Preudhomme, M., Jeuffroy, M.H., Beaudoin, N., (2011) Biomass production, nitrogen accumulation and remobilisation by *Miscanthus × giganteus* as influenced by nitrogen stocks in belowground organs. *Field Crops Research* 121, 381–391.
- Takeda, T.; Oguma, H.; Sano, T.; Yone, Y.; Fujinuma, Y. (2008) Estimating the plant area density of a Japanese larch (*Larix kaempferi* Sarg.) plantation using a ground-based laser scanner. *Agricultural and Forest Meteorology*, Amsterdam, v.148, p.428-438.
- Tayot X, Chartier M, Varlet-Grancher C, Lemaire G. (1995) Potential above-ground dry matter production of *Miscanthus* in north-central France compared to sweet sorghum. In: Chartier P,

Beenackers AACM, Grassi G, editors. Biomass for energy, environment, agriculture and industry: Proceedings of the Eighth European Biomass Conference, Vienna, Austria, 3{5 October 1994. Oxford: Pergamon, 64, p. 556.

Técher, D, Martinez-Chois C, D’Innocenzo, M., Laval-Gilly, P., Bennasroune, A., Foucaud, L., Falla, J., (2010) Novel perspectives to purify genomic DNA from high humic acid content and contaminated soils. Sep. Purif. Technol. 75, 81–86.

Techer D, Martinez-Chois C, Laval-Gilly P., Henry S., Bennasroune A., D’Innocenzo M., Falla J. (2012) Applied Soil Ecology 62, 42– 49.

Teixeira, E.I., Moot, D.J., Brown, H.E., Pollock, K.M., (2007). How does defoliation management impact on yield, canopy forming processes and light interception of lucerne (*Medicago sativa* L.) crops? European Journal of Agronomy 27, 154–164.

Thinggaard, K (1997) Study of the role of *Fusarium* in the field establishment problem of *Miscanthus*. Acta Agric. Scand., 47, 238-241.

Thornton, B., Millard, P., (1997). Increased defoliation frequency depletes remobilization of nitrogen for leaf growth in grasses. Annals of Botany 80, 89–95.

Tomé Jr., J. B. (1997) Manual para Interpretação de Análise de Solo. Editora Guaíba: Agropecuária.

Tzanakakis, V.A., Paranychianakis, N.V., Londra, P.A., Angelakis, A.N. (2011). Effluent application to the land: Changes in soil properties and treatment potential. Ecological Engineering, 37, pp 1757– 1764.

Uellendahl H., Wang G., Moller H.B., Jorgensen U., Skiadas I.V., Gavala H.N., Ahring B.K. (2008) Energy balance and cost-benefit analysis of biogas production from perennial energy crops pretreated by wet oxidation. Water Sci Technol, 58:1841-1847.

Van der Werf H., Meijer W., Mathijssen E., Darwinkel A. (1993) Potential dry matter production of *Miscanthus sinensis* in The Netherlands. Industrial Crops and Products; 1:203, 10.

Vandecasteele, C., Block, C.B. (1993) Modern Methods for Trace Element Determination, John Wiley & Sons, Chichester, Reino Unido, 330 p.

Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., van der Lelie, D., Mench, M. (2009) Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. Environmental Science and Pollution Research, 16, 765–794.

Varennas, A. (2003) Produtividade de solos e ambiente, Escolar Editora, Lisboa, Portugal, 490 p.

Varma, A. (2004) Applied Bioremediation and Phytoremediation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Vazquez-Montiel O, Horan NJ, Mara DD (1996) Management of domestic wastewater for reuse in irrigation, Water Science Technology, 33, 355-62.

Visser, P., Pignatelli, V. (2001) 'Utilisation of *Miscanthus*', in M.B. Jones and M. Walsh (eds.), *Miscanthus for Energy and Fibre*, London, James & James.

Walkley, A., Black, I. (1934) An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 34, 29-38.

Wanat, N., Austruy, A., Joussein, E., Soubrand, M., Hitmi, A., Gauthier-Moussard, C., Lenain, J.F., Vernay, P., Munch, J.C., Pichon, M. (2013). Potentials of *Miscanthus* × *giganteus* grown on highly contaminated Technosols. *Journal of Geochemical Exploration*, 126 – 127, pp 78 – 84.

Wang, D., Portis Jr., A., Moose, S.P., Long, S. P. (2008) Cool C4 Photosynthesis: Pyruvate Pi Dikinase Expression and Activity Corresponds to the Exceptional Cold Tolerance of Carbon Assimilation in *Miscanthus* × *giganteus*. *Plant Physiology*, Vol. 148, pp. 557–567.

Watanabe, F.S. e Olsen, S.R. (1965) Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO₃ extracts from the soil. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 29, 677-78.

Watts, S., Halliwell, L. (1996) Appendix 3 - Detailed field and chemical methods for soil. In: Watts, S. and Halliwell, L. (eds), *Essential Environmental Science, Methods & Techniques*, Routledge, Londres, Reino Unido, pp 475-505.

Wenger, K., Gupta, S.K., Furrer, G., Schulin, R., (2002) Zinc extraction potential of two common crop plants, *Nicotiana tabacum* and *Zea mays*. *Plant and Soil* 242, 217–225.

Weyens, N., van der Lelie, D, Taghavi, S., Vangronsveld, J. (2009) Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 248-254.

Whiting D., Roll M., Vickerman L. (2011) *Plant Growth Factors: Light*. Colorado Master Gardeners Program. Colorado State University Extension.

Xi, Q. (2000) Investigation on the distribution and potential of giant grasses in China, PhD dissertation, University of Kiel, Cuvillier Verlag, Goettingen.

Yamane I, Ito I, Sato K, Kumada D (1958) On the relationship between vegetation and soil at mountain grassland in northeastern Japan. Part 3. Growing process and inorganic and organic constituents of predominant plant species and some characteristics of soil. *Science Reports of the Research Institute, Tohoku University*, 9, 1–43.

Yorgun S., Şimşek Y. E. (2008) Catalytic pyrolysis of *Miscanthus* × *giganteus* over activated alumina. *Bioresource Technology*, 99, 8095-8100.

Yu L., Ding G., Huai Z., Zhao H. (2013) Natural variation of biomass yield and nutrient dynamics in *Miscanthus*, *Field Crops Research*, 151, 1-8.

Zalesny Jr, R.S., Wiese, A. H., Bauer, E. O., Riemenschneider, D. E. (2009) Ex situ growth and biomass of *Populus* bioenergy crops irrigated and fertilized with landfill leachate, *Biomass and Bioenergy*, 33, 62-69 p.

Zema, D., Bombino, G., Andiloro, S., Zimbone, S. (2012). Irrigation of energy crops with urban wastewater: Effects on biomass yields, soils and heating values. *Agricultural Water Management*, 115, pp 55 - 65.

Zhang T., Wyman C. E., Jakob K. and Yang B. (2012) Rapid selection and identification of *Miscanthus* genotypes with enhanced glucan and xylan yields from hydrothermal pretreatment followed by enzymatic hydrolysis - *Biotechnology for Biofuels*, 5:56.

Zub H.W., Arnoult S., Brancourt-Hulmel M. (2011) Key traits for biomass production identified in different *Miscanthus* species at two harvest dates — *biomass and bioenergy* 35, pp 637 – 651.

Anexos

I. Caracterização química da matéria prima e resíduos sólidos

As concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético nos licores resultantes da hidrólise ácida quantitativa da matéria prima e resíduo sólido foram utilizados para o cálculo das percentagens de glucano, xilano, arabinano e grupos acetilo, respectivamente (Eq.V.4-V.7). O resíduo insolúvel em ácido, após correcção das cinzas, permitiu o cálculo da lenhina Klason (Eq. V.8)

Na hidrólise ácida quantitativa uma pequena percentagem de açúcares é degradada, por isso são introduzidos factores de correcção para corrigir as perdas. De acordo com Browning⁴¹ essas perdas são de 2,6% para a glucose, 8,8% para a xilose e 4,7% para a arabinose. Com base nestas percentagens é possível calcular os factores de correcção (F), que permitem corrigir as várias determinações.

$$Gn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{162}{180} \times \frac{Glc \times P_{sol}}{A} \quad (Eq.I.1)$$

$$Xn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{132}{150} \times \frac{Xyl \times P_{sol}}{A} \quad (Eq.I.2)$$

$$Arn = F \times \frac{100}{1005} \times \frac{132}{150} \times \frac{Ara \times P_{sol}}{A} \quad (Eq.I.3)$$

$$GAc = \frac{100}{1005} \times \frac{60}{61} \times \frac{Ac \times P_{sol}}{A} \quad (Eq.I.4)$$

$$LK = \frac{RIA - C}{A} \times 100 \quad (Eq.I.5)$$

- Gn, Xn, Arn, GAc, LK são as percentagens de glucano, xilano, arabinano, grupos acetilo e lenhina Klason, respectivamente (g por 100 g de sólido).

- F é o factor de correcção, por exemplo, para o glucano, $F=1/(1-0,026)=1,027$.

- P_{sol} e A são os pesos da solução e da amostra seca utilizada no ensaio, respectivamente (g).
- RIA e C são os pesos do resíduo insolúvel em ácido e das cinzas da amostra, respectivamente (g).
- Glc, Xyl, Ara e Ac são as concentrações de glucose, xilose, arabinose e ácido acético nos licores (g/L).